

Aus dem Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Thiesen

Infektion mit *Schistosoma mansoni*
zur Charakterisierung der immunologischen Kompetenz
weiblicher STR/ort-Mäuse

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Söhnke Heuer, geb. am 08.07.1990 in Soltau

aus Rostock

Rostock, Juli 2016

Gutachter:

Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke

Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock

PD Dr. Micha Löbermann

Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Zentrum für Innere Medizin, Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. Marylyn M. Addo

I. Medizinische Klinik und Poliklinik (Gastroenterologie mit Sektionen Infektiologie und Tropenmedizin), Zentrum für Innere Medizin, Universitätskliniken Hamburg-Eppendorf

Eingereicht am 25. Juli 2016

Verteidigt am 14. Februar 2018

*meiner Familie
in Dankbarkeit gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Die Schistosomiasis	2
2.1.1 Die Erreger und ihre Krankheitsbilder	2
2.1.1.1 Die urogenitale Schistosomiasis (Blasenbilharziose)	2
2.1.1.2 Die intestinale Schistosomiasis (Darmbilharziose).....	3
2.1.2 Schistosoma mansoni.....	3
2.1.2.1 Entwicklung der Immunantwort bei muriner Schistosomiasis....	5
2.1.2.2 Modulation der Immunreaktion gegen <i>S. mansoni</i>	7
2.2 Der STR/ort-Mausstamm.....	8
2.3 Immunologische Konsequenzen einer Osteopetrose	9
2.4 Motivation und Zielstellung der Arbeit.....	11
3 Material und Methoden	14
3.1 Chemikalien, Antikörper, Geräte und Werkzeuge.....	14
3.2 Software	18
3.3 Versuchstiere.....	18
3.3.1 Mäuse	18
3.3.2 Parasiten und Schnecken	19
3.3.3 Haltung der Versuchstiere.....	19
3.3.4 Infektion der Mäuse.....	19
3.3.5 Euthanasie und Aufarbeitung der Mäuse	20
3.4 ELISA	21
3.4.1 Nachweis von Antikörpern gegen lösliche Antigene des adulten <i>S. mansoni</i> -Wurms	21
3.4.1.1 Gewinnung von adulten Würmern.....	21
3.4.1.2 Herstellung der SWAP-beschichteten Mikrotiterplatte	22
3.4.1.3 Durchführung des anti-SWAP-ELISAs	22
3.4.2 Nachweis von Antikörpern gegen das lösliche <i>S. mansoni</i> -Ei-Antigen.....	22
3.5 Serumbiochemie.....	23
3.6 Leberhistologie	23
3.6.1 Mikroskopische Auszählung der Eier und der Eigranulome	24
3.6.2 Morphometrische Analyse der Granulomgröße	25

3.6.3	Quantitative Analyse der fibrotischen Fläche	25
3.7	Durchflusszytometrie	25
3.7.1	Herstellung einer Zellsuspension aus den entnommenen Lymphknoten und Stimulation der Zytokinproduktion	25
3.7.2	Färben der Oberflächenmarker und intrazellulären Zytokine	26
3.8	Statistische Analysen	27
4	Ergebnisse.....	28
4.1	Die C57BL/6- und STR/ort-Mäuse entwickelten durch die Infektion eine Hepatosplenomegalie	28
4.2	Histologischer Nachweis und Ausmaß der Infektion.....	29
4.2.1	Die Anzahl der Eier und Granulome in den Lebern war zwischen den C57BL/6- und STR/ort-Mäusen vergleichbar	29
4.2.2	Die infizierten STR/ort- und C57BL/6-Mäuse zeigten vergleichbare IgG-Titer gegen SWAP und SEA	30
4.3	Die Marker für eine hepatozelluläre Schädigung fielen im STR/ort-Stamm signifikant geringer aus als im C57BL/6-Stamm	31
4.4	Die STR/ort- und C57BL/6-Mäuse zeigten eine vergleichbare Größe hepatischer Granulome	33
4.5	Das Ausmaß der portalen Fibrosierung war bei den STR/ort- und C57BL/6-Mäusen vergleichbar	33
4.6	Die infizierten STR/ort-Mäuse wiesen einen geringeren Anteil IL-4- und IL- 10-positiver CD4 ⁺ T-Lymphozyten auf	34
5	Diskussion.....	37
5.1	Trotz Hyperlipidämie keine erhöhte Eizahl in den Leberschnitten der STR/ort-Mäuse im Vergleich mit den C57BL/6-Mäusen	37
5.2	Die Produktion von Antikörpern gegen SWAP und SEA	39
5.3	Ausbildung einer Hepatosplenomegalie nach der Infektion	40
5.4	Geringere hepatozelluläre Schädigung im STR/ort-Stamm	40
5.5	Die Cholestaseparameter	42
5.6	Vergleichbare Krankheitsausprägungen wie im C57BL/6-Stamm weisen STR/ort-Mäuse als Vertreter der Stämme mit geringer Krankheitsausprägung aus	43
5.7	Der Einfluss des Zytokinmilieus auf die Krankheitsausprägungen der infizierten STR/ort-Mäuse	46
5.8	Einfluss der Hypercholesterinämie der STR/Ort-Mäuse auf die Zytokin- und Antikörperproduktion.....	49
5.9	Zusammenfassende Schlussbetrachtung der Ergebnisse.....	50
6	Literaturverzeichnis	54
7	Danksagung	62

8 Selbstständigkeitserklärung	63
--	-----------

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
<i>B. glabrata</i>	Biomphalaria glabrata
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-4	Interleukin 4
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KGW	Körpergewicht
MHC-Komplex	<i>Major Histocompatibility-Komplex</i>
PFA	Paraformaldehyd
RANK	<i>receptor activator of NF-κB</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. mansoni</i>	Schistosoma mansoni
SEA	lösliche Eiantigene (<i>soluble egg antigens</i>)
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
spp.	species
SWAP	lösliche Wurmantigene (<i>soluble worm antigen preparation</i>)
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha

1 Zusammenfassung

Für die STR/ort-Maus hat unsere Arbeitsgruppe bereits früher eine Hyperostose mit extramedullärer Hämatopoese, Lymphopenie und Hypogammaglobulinämie beschrieben. Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich diese Einschränkung des Immunsystems auf eine klassische Parasiteninfektion auswirkt. Wir haben deshalb 6-8 Wochen alte STR/ort-Weibchen mit dem Pärchenegel *Schistosoma mansoni* infiziert und anschließend die Immunantwort und Krankheitsausprägung quantifiziert. Als Referenzstamm wählten wir C57BL/6-Mäuse, zu deren Immunreaktion gegen *Schistosoma mansoni* bereits ausführliche Studien vorlagen. Außerdem werteten wir die Hypercholesterinämie der STR/ort-Mäuse als weiteren Hinweis dafür, dass die Schistosomeninfektion im STR/ort-Stamm einen schwereren Verlauf nehmen würde als im C57BL/6-Stamm. Diese Einschätzung sahen wir hauptsächlich durch Hinweise auf eine bei erhöhten Cholesterinspiegel gesteigerte Reproduktion der Schistosomen sowie durch die proinflammatorische Rolle von Cholesterin bei diversen Erkrankungen wie einer nichtalkoholischen Steatohepatitis und der Atherosklerose begründet.

Die STR/ort-Tiere zeigten jedoch insgesamt eine vergleichbare Krankheitsausprägung wie der C57BL/6-Stamm, für den eine eher geringe Krankheitsausprägung bereits beschrieben war. Im Gegensatz zur Ei- und Granulomanzahl in der Leber, der Granulomgröße und zum Ausmaß der Fibrose, die sich allesamt ähnlich im STR/ort- und C57BL/6-Stamm präsentierten, zeigten sich die Serummarker für hepatozellulären Schaden im STR/ort-Stamm jedoch signifikant erniedrigt. Ebenfalls fand sich im STR/ort-Stamm ein tendenziell geringerer Anteil IFN- γ - und TNF- α -positiver sowie ein signifikant geringerer Anteil IL-4- und IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten. Insgesamt deuten unsere Ergebnisse auf eine geringere granulomatöse Entzündungsreaktion im STR/ort-Stamm als im C57BL/6-Stamm hin, die vermutlich auf einer geringeren T-Zellreagibilität basiert. Welche immunomodulatorischen Faktoren dabei eine Rolle spielen, wäre Gegenstand künftiger Studien.

2 Einleitung

2.1 Die Schistosomiasis

Die Bezeichnung Schistosomiasis (Syn.: Bilharziose) umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, die durch humanpathogene Trematoden der Gattung *Schistosoma* hervorgerufen werden. Die Schistosomiasis ist über weite tropische und subtropische Gebiete verteilt. Die Infektion des Menschen erfolgt perkutan durch die in Süßwasser vorkommenden Larven (Zerkarien). Die Zahl infizierter Menschen wird auf 230 Millionen geschätzt. Die Zahl der durch Bilharziose hervorgerufenen Todesfälle ist aufgrund einer hohen Dunkelziffer schwer zu ermitteln. Schätzungen gehen von 20 000 bis 200 000 Todesfällen jährlich aus (Richter & Ruppel 2010).

2.1.1 Die Erreger und ihre Krankheitsbilder

Es werden zwei Hauptformen der Schistosomiasis unterschieden, die sich aus der bevorzugten Lokalisation der Adultwürmer in urogenitalen oder mesenterialen Venen und dem entsprechenden Krankheitsbild ergeben: die urogenitale Schistosomiasis (Blasenbilharziose) und die intestinale Schistosomiasis (Darmbilharziose; Richter & Ruppel 2010).

2.1.1.1 Die urogenitale Schistosomiasis (Blasenbilharziose)

Die Blasenbilharziose wird durch eine Infektion mit *S. haematobium* verursacht. Die adulten Würmer halten sich bevorzugt paarweise vereint in den vesikalen und anderen Venen des kleinen Beckens auf, wo sie ihre Eier ins Gefäßlumen ablegen. Die Eier bleiben in den kleinen Gefäßen stecken, wodurch es zu einer entzündlichen Reaktion (Granulombildung) kommt. Dadurch gelingt den Eiern die Gewebepassage und sie werden über die Harnwege oder den Darm ausgeschieden. Als Folge der Infektion kann es zur Hämaturie,

Kalkeinlagerungen in der Blasenwand und Nierenschäden kommen. Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen dem Auftreten von Blasenkarzinomen und einer *S. haematobium*-Infektion (Richter & Ruppel 2010; Wilson et al. 2007).

2.1.1.2 Die intestinale Schistosomiasis (Darmbilharziose)

Die Erreger der Darmbilharziose sind *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* und *S. intercalatum*.

Da jedoch in dieser Arbeit ausschließlich mit der Trematodenart *Schistosoma mansoni* gearbeitet wurde, beziehen sich die folgenden Beschreibungen und Untersuchungen nur auf diesen Erreger.

2.1.2 *Schistosoma mansoni*

Schistosomen sind getrenntgeschlechtliche Trematoden. Die Entwicklung und der Lebenszyklus der verschiedenen Schistosomenarten gleichen sich im Wesentlichen und werden in [Abb. 1](#) am Beispiel von *S. mansoni* erläutert. Jede Schistosomenart benötigt eine bestimmte Schneckengattung zur ungeschlechtlichen Vermehrung. Bei *S. mansoni* sind es die aquatisch lebenden Schnecken der Gattung *Biomphalaria* spp.

Nach der Infektion eines geeigneten Endwirts (Mensch, Säugetiere) reifen die Erreger zu adulten Würmern. Für die Entwicklung der Geschlechtsreife müssen sich die juvenilen, weiblichen Würmer mit einem männlichen Wurm paaren. Das *S. mansoni*-Pärchen wandert gegen den venösen Blutstrom bis in kleinste mesenteriale Venen und legt dort täglich 250 bis 400 Eier ab. Ein großer Teil dieser Eier bleibt in kleinen Mesenterialvenen stecken. Die folgende granulomatöse Entzündungsreaktion führt zu einer lokalen Gewebsauflösung und ermöglicht so die Passage der Eier durch die Gefäßwand und das umgebende Gewebe. Auf diese Weise werden die Eier, die die Gefäße der Mukosa des Darms oder der Harnwege erreicht haben, ausgeschieden (Richter & Ruppel 2010).

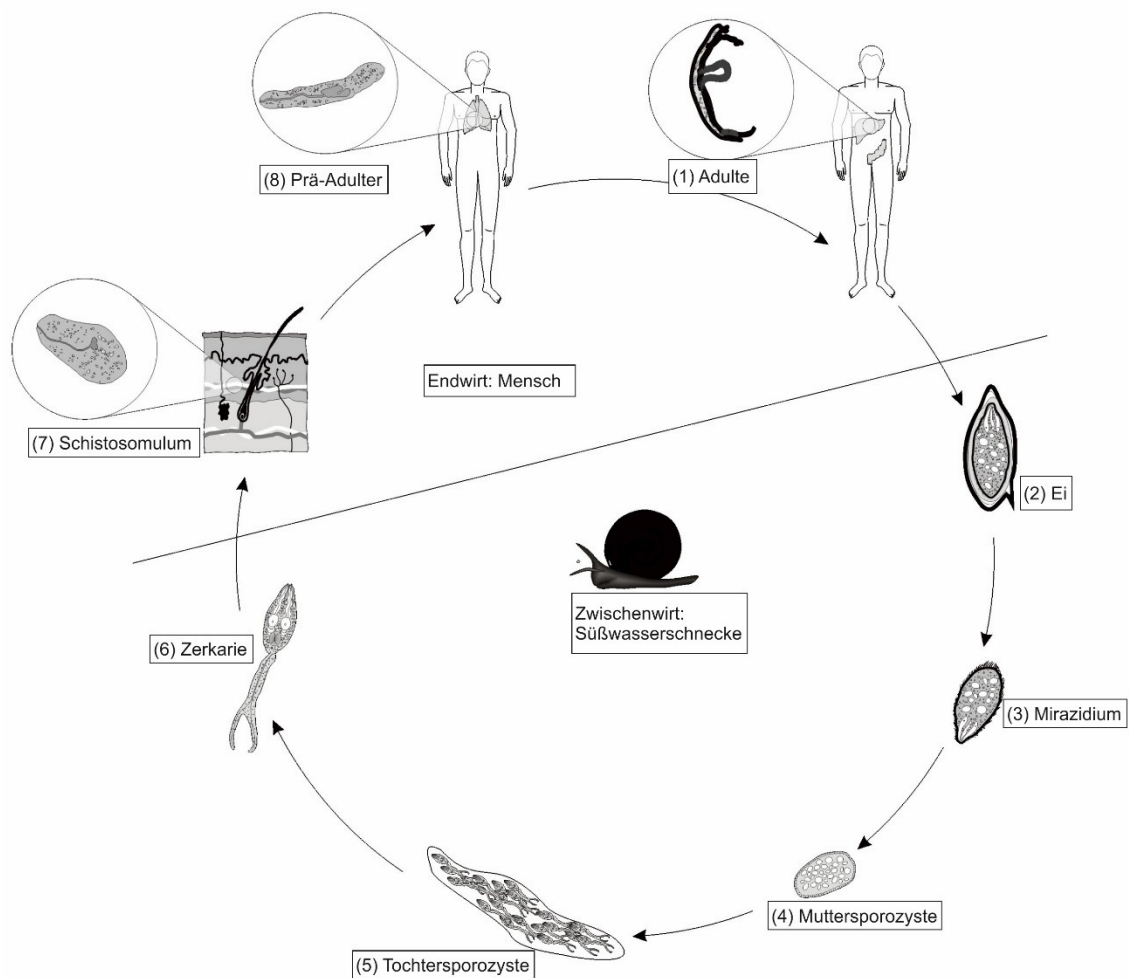


Abb. 1: Lebenszyklus des Pärchenegels *Schistosoma mansoni*.

Dargestellt sind die Entwicklungsstadien des Parasiten unter Berücksichtigung des Wirtswechsels. Die verpaarten, adulten Würmer (1) leben in den Mesenterialvenen des Wirts. Die Eiablage erfolgt ins Gefäßlumen. Die Eier (2) bleiben in den kleinen Gefäßen stecken. Durch die nachfolgende Entzündungsreaktion gelingt den Eiern die Gewebepassage ins Lumen von Harnwegen und Darm und sie werden ausgeschieden. Bei Süßwasserkontakt schlüpft das im Ei lebende Mirazidium (Wimpernlarve) (3) und bewegt sich aktiv durchs Wasser auf der Suche nach einer Wasserschnecke der Gattung *Biomphalaria glabrata*. Nach dem Eindringen in die Schnecke vermehren sich die Mirazidien vegetativ über Muttersporozysten (4) und Tochtorsporozysten (5) zu zahlreichen Zerkarien (6). Diese infektiösen Larven schwärmen aus der Schnecke ins umgebende Wasser und penetrieren die intakte Haut eines Endwirts. Die eingedrungene Zerkarie wirft ihren Ruderschwanz ab und transformiert sich in ein Schistosomulum (7). Das Schistosomulum erreicht mit dem Blutstrom die Lunge und reift dort zum Prä-Adulten (8). Zur endgültigen Reifung wandern die Prä-Adulten ins Portalsystem und bilden Pärchen (Quelle: Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsmedizin Rostock).

Die krankheitsbestimmenden Faktoren sind jedoch der Anteil der nicht ausgeschiedenen Eier und die gegen sie ausgelöste Immunreaktion. Etwa die Hälfte der produzierten Eier verbleibt im Körper. Die Eier bleiben nicht nur in der Nähe der adulten Würmer in und um die kleinen Venen von Darm und Harnwegen liegen, sondern werden auch mit dem venösen Blutstrom in verschiedene Organe des menschlichen Körpers geschwemmt. Davon ist besonders die Leber

betroffen, in deren präsinusoidalen Pfortaderästen die Eier stecken bleiben. Dies stellt aus reproduktiver Sicht eine Sackgasse dar, da die Weiterentwicklung der Eier nur durch Süßwasserkontakt gelingen kann. Diese Eier stellen die Grundlage aller pathologischen Veränderungen der Schistosomiasis dar, indem zunächst eine perioovuläre, granulomatöse Entzündungsreaktion entsteht und anschließend das Gewebe fibrotisch umgewandelt wird.

Schließlich bewirkt die progressive, portale Fibrosierung bei Patienten mit chronischer *S. mansoni*-Infektion die Entwicklung einer portalen Hypertension. Deren typische Komplikationen sind die Entstehung eines Aszites sowie potentiell letaler Ösophagus- und Magenfundusvarizenblutungen (Stadecker et al. 2001; Richter & Ruppel 2010).

2.1.2.1 Entwicklung der Immunantwort bei muriner Schistosomiasis

Während der frühen Akutphase der Infektion des Endwirts lösen das wandernde Schistosomulum und der daraus hervorgehende unreife, adulte Wurm eine von T-Lymphozyten des Subtyps 1 (Th1) dominierte Immunreaktion aus. Diese ist durch die erhöhte Präsenz der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-12, IFN- γ und TNF- α charakterisiert (Chuah et al. 2014; Stadecker et al. 2004).

Für das Überleben der reifen, adulten Würmer ist es wichtig, dass sie vom Immunsystem weitgehend unentdeckt bleiben. Dazu nutzen sie verschiedene Evasionsstrategien. Einerseits besitzen die adulten Würmer eine als Membranokalyx bezeichnete Doppelmembranstruktur an ihrer Oberfläche, die wirtseigene Glykolipide (z.B. von Erythrozyten) binden kann und so verhindert, dass das Immunsystem den Parasiten als „fremd“ erkennt (Braschi & Wilson 2006). Andererseits verfügen die Adulten über parasitäre Proteasen, die gebundene Antikörper und Komplementfaktoren inaktivieren können (Richter & Ruppel 2010).

Im Gegensatz zu den adulten Würmern präsentieren die Wurmeier eine Reihe starker Antigene. Diese vom im Ei lebenden Mirazidium produzierten Antigene (Proteine, Glykoproteine, Stoffwechselprodukte) werden als lösliche Eiantigene (*soluble egg antigen*, *SEA*) bezeichnet und über die Eischale sezerniert (Richter & Ruppel 2010). Während zu Beginn der Eiablage (5-6 Wochen nach Infektion)

noch die von Th1-Lymphozyten sezernierten Zytokine dominieren, induzieren die Eiantigene eine ausgeprägte Th2-polarisierte Immunantwort, die etwa 8 Wochen nach Infektion ihren Höhepunkt erreicht. Diese Th2-Antwort zeichnet sich durch die antientzündlichen und profibrotischen Zytokine IL4, IL-5, IL-10 und IL-13 aus (Stadecker et al. 2004). Anschließend wird die Th2-Antwort im Rahmen der sogenannten Immunomodulation herunterreguliert und geht ab der 12. Woche in die chronische Phase über (Pearce & MacDonald 2002; Barron & Wynn 2011). Durch die Zytokine der Th2-Lymphozyten werden Makrophagen alternativ aktiviert, die nach neuer Nomenklatur nach ihrem Aktivator als $M_{(IL-4/IL-13)}$ bezeichnet werden (Murray et al. 2014; van den Bossche et al. 2015). Diese Makrophagen hemmen die Th1-dominante Immunantwort, tragen zur fibrotischen Wundheilung der Entzündungsherde bei und produzieren IL-10, Arginase-1 und andere Faktoren, die über eine negative Feedbackschleife die T-Zellproliferation und -aktivierung begrenzen (Barron & Wynn 2011).

Eine entscheidende Immunreaktion des Wirts auf die Schistosomeneier ist die Bildung von Granulomen (Abb. 2). Die Formierung der Granulome wird durch $CD4^+$ T-Lymphozyten organisiert, die durch die Eiantigene stimuliert worden sind. Dabei wandern $CD4^+$ T-Lymphozyten, Makrophagen, Eosinophile und Fibroblasten in das Gebiet um das Wurmei herum ein und bilden so eine Barriere zum umgebenden Gewebe. Nach Absterben des Mirazidiums im Ei kommt es zum Zerfall der Granulomstruktur mit einhergehender Kalzifizierung (Chuah et al. 2014).

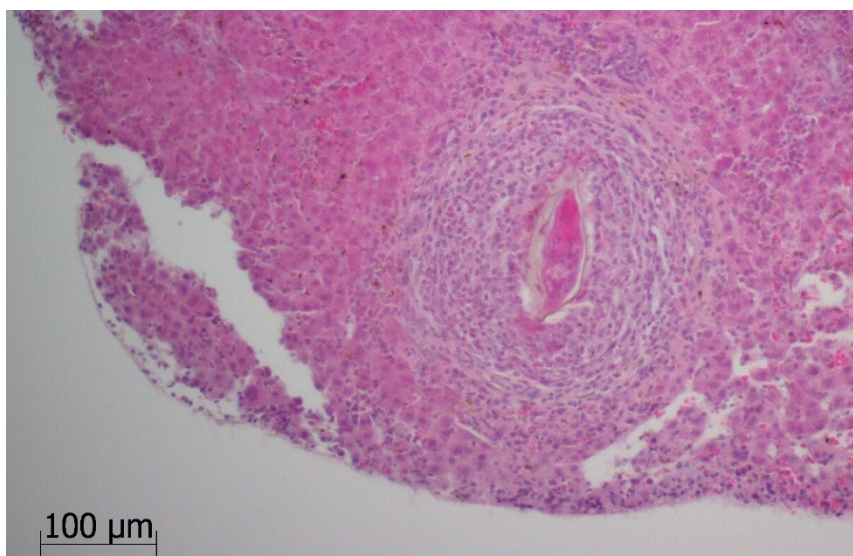


Abb. 2: Granulombildung um ein *S. mansoni*-Ei in der Leber eines C57BL/6-Weibchens (H&E-Färbung, 400-fache Vergrößerung). Im Ei ist das lebende Mirazidium erkennbar.

Obwohl die perioovuläre Granulombildung einerseits schädliche Effekte (Fibrose und anschließende portale Hypertension) auf den Wirt hat und somit von entscheidender Bedeutung für die Krankheitserscheinungen der Schistosomiasis ist, erfüllen die Granulome andererseits gleichzeitig eine wichtige Schutzfunktion für den Wirt (Pearce & MacDonald 2002). Denn die Schistosomeneier und die von ihnen sezernierten Produkte bedeuten eine ständige Antigenpräsentation für das Immunsystem des Wirts. Würden die Antigene nicht durch die Granulome sequestriert oder neutralisiert, könnte die resultierende unkontrollierte Entzündungsreaktion das betroffene Gewebe schädigen. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, deren Granulombildung durch unterschiedliche immunologische Störungen fehlerhaft ist, früher sterben als Kontrolltiere mit intakter Granulombildung (Wilson et al. 2007).

2.1.2.2 Modulation der Immunreaktion gegen *S. mansoni*

Das Krankheitsausmaß der *S. mansoni*-Infektion variiert stark, sowohl unter Menschen als auch zwischen verschiedenen Mausstämmen (Rutitzky & Stadecker 2011). Dabei ist das Aufrechterhalten einer balancierten und kontrollierten Th1- oder Th2-dominanten Immunantwort entscheidend für den Wirt, da auf diese Weise eine schützende Granulombildung bei nicht überzogener pathologischer Gewebeveränderung ermöglicht wird. Jede starke Polarisierung der Immunreaktion zu einer Th1- oder Th2-dominanten Antwort bei Schistosomiasis ist schädlich oder sogar tödlich für den Wirt (Wilson et al. 2007). So wiesen beispielsweise Mäuse, die aufgrund einer IL-10- und IL-4-Defizienz eine unkontrollierte Th1-dominante Immunreaktion zeigten, eine 100%ige Mortalität 9 Wochen nach Infektion auf. Ähnlich verhielt es sich bei Mäusen, die aufgrund einer IL-10- und IL-12-Defizienz eine starke Th2-Antwort zeigten und im Alter von 12-15 Wochen eine signifikante Mortalität aufwiesen (Hoffmann et al. 2000). Als Faktoren, die mit einem schweren Krankheitsverlauf einhergehen, konnte ein Anstieg des von Th1-Lymphozyten sezernierten IFN- γ sowie des von Th-17-Lymphozyten produzierten IL-17 nachgewiesen werden, wobei der Anstieg des IL-17 eher als Marker eines schweren Verlaufs zu werten ist (Rutitzky et al. 2005a; Rutitzky et al. 2005b). IL-17-defiziente Mäuse weisen entsprechend eine deutlich reduzierte Immunopathologie auf (Rutitzky & Stadecker 2011).

Nach der akuten Phase der Infektion (0 bis 8 Wochen *post infectionem*) beginnt das sukzessive Herunterregulieren der Th2-dominanten Antwort, die sogenannte Immunomodulation, die sich durch eine abgeschwächte T-Zellfunktion und sich geringer ausprägende Krankheitserscheinungen auszeichnet. So kommt es innerhalb der Mausstämmen zu einer im Vergleich zur akuten Phase geringeren Größe der sich neu bildenden Granulome. Bei der Immunomodulation wirken IL-10 und TGF- β mit, indem sie die Entwicklung regulatorischer T-Zellen induzieren, welche die Balance von Th1- und Th2-Antwort fördern (Chuah et al. 2014). IL-10-defiziente Mäuse schaffen hingegen keinen Übergang von der akuten in die chronische Krankheitsphase und präsentieren große unzureichend begrenzte Granulome sowie eine verstärkte hepatozelluläre Nekrose (Sadler et al. 2003).

2.2 Der STR/ort-Mausstamm

Im Mausstamm STR/1N trat 1951 in der 29. Nachkommengeneration eine rotbraun-weiß gescheckte Mutante auf. Aus dieser Mutante entstand nach einer Periode ohne Inzucht der STR/ort-Stamm, der daraufhin wieder mit Inzucht gezüchtet wurde (Mason et al. 2001).

Der STR/ort-Stamm konnte sich als Modell für die Erforschung der Entstehung der Kniegelenksarthrose (*Gonarthrose*) etablieren, da sich besonders bei den männlichen Tiere häufig eine spontane Arthrose des Kniegelenks entwickelt (Walton 1977; Mason et al. 2001). Interessanterweise weist der STR/ort-Stamm auch metabolische Besonderheiten auf. So konnte bei diesen Mäusen eine Hyperlipidämie (in diesem Fall Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie) sowie eine Hyperinsulinämie nachgewiesen werden (Uchida et al. 2009). Außerdem zeigen weibliche STR/ort-Mäuse eine Neigung zur Fettleibigkeit (Walton 1979). Doch auch das Gewicht der Männchen des STR/ort-Stamms ist im Vergleich mit dem C57BL/6-Stamm deutlich erhöht.

Eine weitere relevante Eigenschaft des STR/ort-Stamms ist, dass er eine Hyperplasie von Knochensubstanz, also eine Hyperostose, aufweist. Es gibt Anzeichen dafür, dass die Hyperostose des STR/ort-Stamms sowohl durch eine erhöhte Neubildung von Knochen durch Osteoblasten als auch durch eine gestörte Knochenresorption durch Osteoklasten bedingt ist (Uchida et al. 2012;

Pasold et al. 2013). Im Vergleich mit C57BL/6-Mäusen zeigten STR/ort-Mäuse beider Geschlechter bereits im Alter von 1 Monat eine deutlich dickere Kortikalis der Femurdiaphyse. Im Alter von 9 Monaten lag eine fast vollständige Kompression des Knochenmarks vor. Bei der Analyse des trabekulären Knochens der Femurmetaphysen zeigte sich, dass im Alter von 1 Monat das Verhältnis von Knochenvolumen zum Gesamtvolumen (BV/TV) noch vergleichbar war. Während es jedoch im Verlauf von 9 Monaten zu einem Absinken des BV/TV bei den C57BL/6-Weibchen auf etwa 20% kam, stieg der Wert bei den STR/ort-Weibchen auf etwa das zehnfache des im Alter von 1 Monat gemessenen Wertes. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Mäuse des STR/ort-Stamms im Alter von 13 Wochen nur eine Anzahl an Knochenmarkszellen aufwiesen, die etwa 6% der bei den C57BL/6-Mäusen gemessenen Zellanzahl entsprach. Schließlich konnten eine mit der Kompression des Knochenmarks assoziierte Hepatosplenomegalie und extramedullärer Hämatopoese nachgewiesen werden (Pasold et al. 2013).

2.3 Immunologische Konsequenzen einer Osteopetrose

Die Osteopetrose stellt eine heterogene Gruppe von Knochenerkrankungen dar und ist charakterisiert durch eine Osteoklasteninsuffizienz mit gestörter Knochenresorption (Del Fattore et al. 2008). Da auch bei den STR/ort-Mäusen eine Störung der Osteoklastenfunktion vorliegt (Pasold et al. 2013), kann der Knochenphänotyp dieser Mäuse auch als mindestens teilweise osteopetrotisch angesehen werden. Interessanterweise konnte bei mehreren Mausmodellen, die unterschiedliche Formen einer Osteopetrose präsentieren, eine Störung in verschiedenen Bereichen des Immunsystems nachgewiesen werden. *cd/cd*-Mäuse sind als Modell zur Erforschung der humanen infantilen malignen Osteopetrose etabliert. Blin-Wakkach et al. (Blin-Wakkach et al. 2004) zeigten, dass die B-Zelldifferenzierung durch einen fehlerhaften Übergang der pro-B-Lymphozyten in prä-B-Lymphozyten in diesem Stamm gestört ist. Außerdem wiesen sie bei den *cd/cd*-Mäusen eine deutlich reduzierte Sekretion von IFN- γ durch aktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten nach. Bei Receptor Activator of NF- κ B (RANK)-defizienten Mäusen zeigte sich nicht nur eine Osteopetrose, sondern

auch eine Störung der B-Zellentwicklung und der Bildung von Lymphknoten (Dougall et al. 1999).

Auch bei der Untersuchung von humanen Formen einer Osteopetrose zeigten sich immunologische Störungen. Guerrini et al. (Guerrini et al. 2008) fanden eine Hypogammaglobulinämie bei Patienten, die aufgrund einer RANK-Mutation an einer osteoklastenarmen Form der autosomal-rezessiven Osteopetrose litten.

Die Vermutung liegt nahe, dass weibliche STR/ort-Mäuse aufgrund ihres hyperostotischen Knochenphänotyps, der zumindest teilweise auf einem Osteoklastendefekt beruht, auch mindestens eine partielle Immuninsuffizienz aufweisen könnten. Es gibt jedoch aktuell keine Literatur, die sich mit der Immunkompetenz weiblicher STR/ort-Mäuse befasst.

Unveröffentlichte Untersuchungen von Pasold zur zellulären Zusammensetzung der Milz (Abb. 3) zeigen, dass uninfizierte STR/ort-Mäuse im Vergleich zu

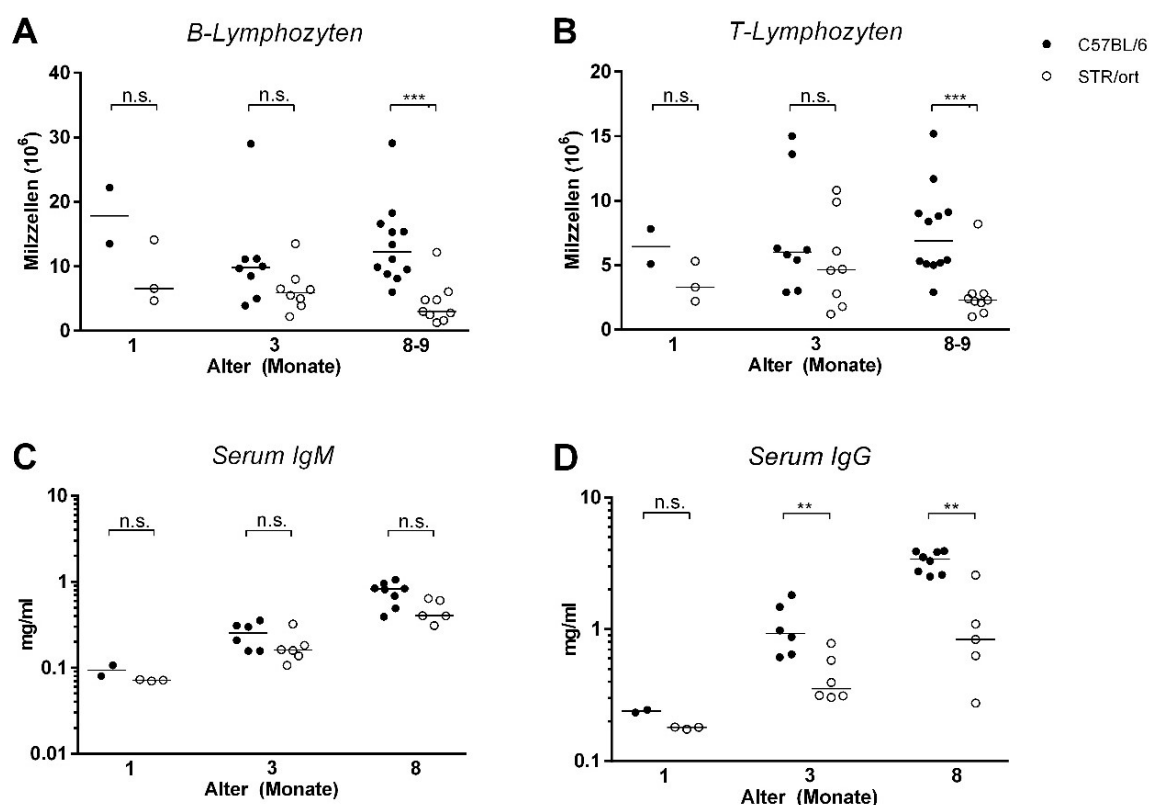


Abb. 3: Die STR/ort-Mäuse zeigen im Vergleich mit den C57BL/6-Mäusen geringere Zellzahlen der B- und T-Lymphozyten im Alter von 8-9 Monaten sowie Anzeichen eines gestörten Klassenwechsels von IgM auf IgG. Weiblichen und männlichen STR/ort- und C57BL/6-Mäusen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Milz entnommen und die absolute Anzahl an Milzzellen bestimmt. Anschließend wurde der Anteil an B-Lymphozyten (A) und T-Lymphozyten (B) an den Milzzellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Bestimmung der IgM- (C) und IgG-Titer (D) im Serum erfolgte mittels ELISA.

C57BL/6- Mäusen bereits im Alter weniger Wochen reduzierte Mengen an B- und T-Lymphozyten aufweisen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dann bei 8-9 Monate alten Mäusen. Weiterhin war auffällig, dass sich zwar die IgM-Titer in beiden Stämmen auf ähnlichem Niveau bewegten, die IgG-Titer jedoch bereits bei den 3-monatigen Mäusen im STR/ort-Stamm signifikant niedriger lagen als im C57BL/6-Stamm. Hieraus ergab sich die Vermutung, dass der Antikörperklassenwechsel von IgM zu IgG im STR/ort-Stamm gestört sein könnte. Außerdem konnte dieses Ergebnis als Hinweis auf eine potenzielle Störung der Zykokinproduktion der CD4⁺ T-Lymphozyten verstanden werden, da diese T-Zellen den Isotypenswitch durch die Sekretion diverser Zytokine entscheidend unterstützen.

Interessanterweise lieferte [Abb. 3](#) Hinweise darauf, dass sich die signifikanten Abweichungen von der Norm bereits in einem Alter manifestieren, in dem die Kompression des Knochenmarks erst beginnt. Dies führte zu der Annahme, dass die Reduktion der Lymphozytenpopulationen in den jungen STR/ort-Mäusen nicht (nur) durch die Kompression des Knochenmarks, sondern auch genetisch bedingt sein könnte.

2.4 Motivation und Zielstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, durch eine parasitäre Infektion mit *S. mansoni* die Immunkompetenz weiblicher STR/ort-Mäuse zu untersuchen. Unsere Hypothese war, dass im STR/ort-Stamm die Immunreaktion gegen *Schistosoma mansoni* aufgrund der Lymphopenie und der Hypogammaglobulinämie gestört sein und die Infektion daher einen schwereren Verlauf nehmen könnte. Außerdem werteten wir die Hypercholesterinämie der STR/ort-Mäuse aus verschiedenen Gründen als ungünstigen Faktor: Erstens gilt Cholesterin bei verschiedenen Erkrankungen wie einer nichtalkoholischen Steatohepatitis oder der Atherosklerose als Triggerfaktor einer Entzündungsreaktion. Es wäre denkbar, dass auch die granulomatöse Entzündungsreaktion gegen die Schistosomeneier durch Cholesterin gefördert würde. Zweitens hatte sich in Untersuchungen gezeigt, dass fettreich ernährte Mäuse zwar noch nicht während des Abklingens der akuten Phase der Schistosomeninfektion, jedoch während der chronischen Phase der Infektion eine signifikant erhöhte Anzahl an Eiern im Leber- bzw.

Darmgewebe aufwiesen (Neves et al. 2007; Alencar, Alba Cristina Miranda de Barros et al. 2009). Die Autoren betrachteten die erhöhten Cholesterolspiegel der fettreich ernährten Mäuse in ihrer Studie als begünstigenden Faktor einer gesteigerten Eiproduktion. Obwohl auch unsere Mäuse schon während der akuten Phase der Infektion aufgearbeitet wurden, interessierte uns, ob sich bereits ein fördernder Einfluss der genetisch bedingten Hypercholesterinämie der STR/ort-Mäuse auf die Eiproduktion nachweisen ließe.

Da wir mit der Schistosomeninfektion der STR/ort-Mäuse Neuland betraten, entschieden wir uns dazu, die Untersuchungsergebnisse im Vergleich zu einem etablierten Referenzstamm darzustellen. Als Referenzstamm wählten wir C57/BL6-Mäuse, da diese den gleichen MHC-Haplotypen aufweisen wie STR/ort-Mäuse und wir somit das Problem unterschiedlicher MHC-Haplotypen zwischen den Stämmen als potentielle Einflussgröße auf die Stärke der Immunantwort umgehen konnten.

Für das weibliche Geschlecht haben wir uns entschieden, weil die Hyperostose in den Weibchen noch deutlich schwerer ausgeprägt ist als bei den Männchen, im Alter von 3 Monaten das Knochenmark der Röhrenknochen bereits komplett verdrängt ist und wir deswegen eine stärkere Einschränkung der Immunantwort als bei den Männchen erwartet hatten.

Da die Infektion der STR/ort-Weibchen mit *S. mansoni* ein klassisches Modell der Parasitenabwehr darstellte, untersuchten wir in dieser Studie hauptsächlich die humorale Immunantwort, die Ausprägung der CD4⁺ T-Zellantwort sowie die Schwere der Krankheitsausprägungen in den Stämmen.

Unsere Hypothese eines schwereren Krankheitsverlaufs bei STR/ort-Mäusen im Vergleich mit C57BL/6-Mäusen wollten wir dabei anhand von vier Einzelfragen überprüfen:

- 1. Zeigt sich 8 Wochen *post infectionem* – insbesondere aufgrund der genetisch bedingten Hyperlipidämie der STR/ort-Mäuse – im STR/ort-Stamm eine erhöhte Eianzahl im Lebergewebe im Vergleich zum C57BL/6-Stamm?**

2. Zeigt der STR/ort-Stamm eine schwächere Antikörperproduktion gegen *S. mansoni*-Antigene als der C57BL/6-Stamm?
3. Zeigen sich im STR/ort-Stamm schwerere Organschäden und – veränderungen (hepatozellulärer Schaden, Granulomgrößen, hepatische Fibrose, Körper- und Organgewicht) nach der *S. mansoni*-Infektion als im C57BL/6-Stamm?
4. Welche Zusammenhänge zwischen den Krankheitsausprägungen der STR/ort- und C57BL/6-Mäuse und der jeweiligen Zytokinproduktion der CD4⁺-T-Lymphozyten lassen sich aufzeigen?

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Antikörper, Geräte und Werkzeuge

Tabelle 1: Kits und Chemikalien

Kit / Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M3148
Bio-Rad Protein Assay Kit II	Bio-Rad	500-0002
bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth	3737
Brefeldin A Lösung (1000x)	BioLegend	420601
Carbonat-Bicarbonat-Puffer (Kapseln)	Sigma-Aldrich	C3041-50CAP
Cell Stimulation Cocktail (500x)	eBioscience	00-4970
CompBeads, Kompensations-partikel-Set (α -Ratte- und α -Hamster-Ig κ / Negativkontrolle)	BD	552845
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth	X883
Eisessig	Carl Roth	3738
Ethanol, reinst und vergällt	Apotheke des Universitätsklinikums Rostock	
Fast Green FCF	Fisher Scientific	BP123-10
fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom	S 0615
Formalin, neutral gepuffert, 10%	Sigma-Aldrich	HT501128
Heparin-Natriumsalz, ≥ 180 USP Einheiten/mg	Sigma-Aldrich	H3149-25KU
IL-2, rekombinant, murin	Biolegend	575402
Kanadabalsam	Carl Roth	8016
Kaninchen F(ab') ₂ anti-Maus IgG	Serotec	STAR13B
Ketamin 10%	Medistar	3233
Mausnormalserum, gepoolte Maussera	eigene Herstellung	
Mayers Hämlaunlösung	Merck	109249
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich	199931
Natriumpyruvat-Lösung (100mM)	Gibco	11360-070
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich	P6148

Kit / Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
Penicillin / Streptomycin (5000 U/ml)	Gibco	15070
Peroxidase AffiniPure Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch	115-035-003
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 10x)	Ambion	AM9624
Pikrinsäure, gesättigt (1,3% in H ₂ O)	Sigma-Aldrich	P6744
Rompun® 2% Injektionslösung	Bayer	
RPMI 1640	Gibco	11875
RPMI 1640 + GlutaMAX –I + 25mM HEPES	Gibco	72400-021
Saponin	Sigma-Aldrich	47036-50G-F
Schistosoma mansoni IgG ELISA	Hölzel	40-521-475124
Sirius Red (Direct Red 80)	Sigma-Aldrich	365548
Stopplösung	Invitrogen	SS03
TMB-Einfachlösung	Invitrogen	00-2023
Trypanblau	Gibco	15250-061
Tween 20	Sigma-Aldrich	P1379-25ML

Tabelle 2: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Reaktivität	Konjugat	AK-Volumina / 100 µl Zellsuspension	Klon	Hersteller	Bestellnummer
α-mouse CD3ε	PE/Cy7	2 µl	145-2C11	BioLegend	100319
α-mouse CD4	PerCP	1 µl	RM4-5	BD	553052
α-mouse CD8a	APC/Cy7	1 µl	53-6.7	BioLegend	100713
α-mouse IFN-γ	APC	3 µl	XMG1.2	BD	554413
α-mouse IL-4	Alexa Fluor® 488	2 µl	11B11	BD	557728
α-mouse IL-10	Brilliant Violet 421	3 µl	JES5-16E3	BioLegend	505021
α-mouse IL-17A	Brilliant Violet 510	2,5 µl	TC11-18H10.1	BioLegend	506933
α-mouse TNF-α	PE	1 µl	MP6-XT22	BioLegend	506305
Isotype Ctrl Rat IgG1	Alexa Fluor® 488	2 µl	RTK2071	BioLegend	400417

Reaktivität	Konjugat	AK-Volumina / 100 µl Zellsuspension	Klon	Hersteller	Bestell- nummer
Isotype Ctrl Rat IgG1	APC	3 µl	RTK2071	BioLegend	400411
Isotype Ctrl Rat IgG1	PE	1 µl	R3-34	BD	554685
Isotype Ctrl Rat IgG1	Brilliant Violet 510	2,5 µl	RTK2071	BioLegend	400435
Isotype Ctrl Rat IgG2b	Brilliant Violet 421	3 µl	RTK4530	BioLegend	400639

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien, Geräte und Werkzeuge

Bezeichnung	Hersteller
Bechergläser	Schott
Einmalspritzen, steril; 1 ml	Braun
Einmalspritzen, steril; 20 ml	BD
Mikroplattenphotometer „Milenia Kinetic Analyser“	Diagnostic Products Corporation
Mikroplattenphotometer „Multiskan EX“	Thermo Scientific
Eppendorf-Röhrchen; 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
FACSAria II	BD
Feinwaage Explorer	Ohaus
Inkubator, wasserummantelt, Typ 3548	Forma Scientific
Kryoröhrchen, 2 ml	Nalgene
Lichtmikroskop Axio Imager M2	Zeiss
Lichtmikroskop Axioplan 2 Imager	Zeiss
Mikro-Schraubröhre 2ml, Polypropylen	Sarstedt
Mikrotiterplatte, 96 well, flach	Nunc
Mikrovolumenspektralphotometer Colibri	Titertek-Berthold
Neubauer Zählkammer	Brand
Petrischalen	Greiner Bio-One
Pipettierhilfe "Pipetboy"	Integra Biosciences
Polypropylen-Röhrchen, konisch; 15 und 50 ml	Greiner Bio-One
Rotationsmikrotom Hyrax M55	Zeiss
Scanningtisch K011	Wienecke & Sinske
Sicherheitswerkbank Herasafe® KS12	Heraeus
Zellkulturmikroplatte, 96 well, flach	Greiner Bio-One
Zellsieb; 40µm, 70µm	BD Falcon
Zentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus

Tabelle 4: Für diese Arbeit hergestellte Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Beschichtungspuffer (pH 9,6)	1 Kapsel Carbonat-Bicarbonat und 100 ml Aqua bidest., pH einstellen
β -Mercaptoethanol-Vorverdünnung	2 µl β-Mercaptoethanol und 570 µl Zellkulturmedium
Blocklösung (PBS pH 7,4; 1% BSA)	1 g BSA und 100 ml PBS pH 7,4
FACS-Puffer (PBS pH 7,4; 0,5% BSA; 0,1% NaN ₃)	2,5 g BSA, 0,5 g NaN ₃ und 500 ml PBS pH 7,4
Paraformaldehyd-Lösung (PBS pH 7,4; 2% PFA)	2 g PFA und 100 ml PBS pH 7,4
PBS (pH 7,4)	100 ml PBS (10x) und 900 ml Aqua dest., pH einstellen
Saponin-Puffer (FACS-Puffer; 0,5% Saponin)	0,25 g Saponin und 50 ml FACS-Puffer
T-Zell-Kulturmedium	50 ml Zellkulturmedium, 500 µl Natriumpyruvat-Lsg., 50 µl β -Mercaptoethanol-Vorverdünnung und 5 µl rekombinantes, murines IL-2
Waschpuffer	500 µl Tween 20 und 1000 ml PBS pH 7,4
Zellkulturmedium (RPMI 1640 + GlutaMAX –I + 25mM HEPES; 10% FCS; 1% Penicillin / Streptomycin)	50 ml fötales Kälberserum, 5 ml Penicillin / Streptomycin und 500 ml RPMI 1640 + GlutaMAX –I + 25mM HEPES,

Tabelle 5: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Fixierung: 10%iges Formalin		
Technik		Zeit
1.	Entparaffinieren der Schnitte bis ins Aqua dest.	
2.	Hämalaun (1:2,5 verdünnt mit Bidest)	25 sek
3.	Fließendes Leitungswasser	30 min
4.	Aqua dest.	5 min
5.	Eosin-Eisessig-Gemisch (Eosin 0,5% und Eisessig im Verhältnis 500:1)	10 min
6.	Dreimal in Aqua dest. Eintauchen	
7.	Entwässern	
8.	Eindecken in Kanadabalsam	

Tabelle 6: Sirius Red-/ Fast Green-Färbung

Fixierung: 10%iges Formalin	
Technik	Zeit
1. Entparaffinieren der Schnitte bis ins Aqua dest.	
2. Fast Green 0,1% in Aqua dest.	15 min
3. Essigsäure 1% in Aqua dest.	2 min
4. Fließendes Leitungswasser	5 min
5. Gesättigte, wässrige Pikrinsäure	5 min
6. Sirius Red 0,1% in gesättigter, wässriger Pikrinsäure	30 min
7. Fließendes Leitungswasser	5 min
8. Rasches Entwässern und Eindecken in Kanadabalsam	

3.2 Software

Tabelle 7: Programme der verschiedenen Hersteller

Programm	Version	Hersteller	verwendet für
CorelDRAW X6	16.2.	Corel Corporation	Bildbearbeitung
GraphPad Prism	6	GraphPad Software, Inc.	Statistische Auswertung
ImageJ	1.48v	National Institutes of Health, Bethesda, USA	Bildanalyse

3.3 Versuchstiere

3.3.1 Mäuse

Der STR/ort-Mausstamm ist ein Inzuchtstamm und wurde ursprünglich von Harlan Winkelmann (Borchen, Germany) bezogen. Bei dem C57BL/6-Stamm handelt es sich ebenfalls um einen Inzuchtstamm, welcher ursprünglich von Charles River (Sulzfeld, Germany) bezogen wurde. Der NMRI-Mausstamm (Harlan Winkelmann, Horst, Netherlands) ist ein sehr robuster Auszuchtstamm. 6 bis 8 Wochen alte, weibliche NMRI-Mäuse dienen in dieser Arbeit genutzten Schistosomen-Mauszyklus als Endwirte der Aufrechterhaltung des Zyklus.

Mittlerweile werden alle erwähnten Mausstämme in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock unter spezifischen keimfreien Bedingungen gezüchtet. Alle im Versuch verwendeten Mäuse entstammen dieser Zucht.

3.3.2 Parasiten und Schnecken

Der *Schistosoma mansoni*-Stamm, der Teil des in dieser Arbeit genutzten Schistosomen-Mauszyklus ist, stammt ursprünglich aus Puerto Rico. Mit den Mirazidien dieses Stammes wurden Süßwasserschneckenstamm der Gattung *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*) infiziert, sodass die Schnecken als Zwischenwirt dienten. Ursprünglich stammen die Schnecken ebenfalls aus Puerto Rico.

3.3.3 Haltung der Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden im Tierstall der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsmedizin Rostock gehalten. Der Stall hat einen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus und eine Raumtemperatur von 26°C. Die Schnecken wurden in gefiltertem Aquariumwasser gehalten und wurden mit Alleinfuttermittel für Garnelen (NovoPrawn, JBL GmbH, Neuhofen, Germany) gefüttert. Die Mäuse bekamen Standardfutter (ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) und Wasser ad libitum, die Haltung erfolgte in Vierer- oder Fünfergruppen. Alle im Rahmen der Promotionsarbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen 7221.3-2.5-003/10; 7221.3-1.1-034/11).

3.3.4 Infektion der Mäuse

Die Infektion sowie die Aufarbeitung der Mäuse und die Durchführung des unten beschriebenen Nachweises der gegen SWAP (*soluble worm antigen preparation*) gerichteten Antikörpern erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Labor für medizinische Parasitologie der Abteilung für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger.

Zur Infektion der 6 bis 8 Wochen alten STR/ort- und C57BL/6-Mäuse wurden mit *S. mansoni* infizierte Schnecken zunächst einzeln in Reagenzgläsern mit Aquariumwasser für 90 min abgedunkelt und anschließend zwei Stunden lang starkem Licht ausgesetzt. Durch den Lichtreiz wurde die Auswanderung der

reifen Zerkarien aus der Schnecke stimuliert. Die Anzahl der Zerkarien/ml Wasser wurde mikroskopisch bestimmt. In dieser Arbeit erfolgte eine Infektion mit 50 Zerkarien je Maus. Hierzu wurden Bechergläser mit Aquariumwasser bis zu einer Füllhöhe von ca. 0,5 cm befüllt und anschließend das entsprechende Volumen an zerkarienhaltigem Wasser hinzugefügt. Dann wurden die Mäuse jeweils in ein Becherglas gesetzt und während des einstündigen Wasserbads infiziert.

3.3.5 Euthanasie und Aufarbeitung der Mäuse

Acht Wochen nach der Infektion wurden die Versuchstiere aufgearbeitet. Zunächst wurden die Mäuse gewogen. Dann erfolgte die Euthanasie durch die intraperitoneale Injektion eines Betäubungsmittelgemisches (bestehend aus (8 mg Xylazin + 120 mg Ketamin)/kg KGW) und anschließende Dekapitation. Dabei wurde aus den durchtrennten Halsschlagadern das Blut gewonnen. Im Anschluss wurde das Blut 15 min bei 1500 rpm zentrifugiert, danach das Serum abpipettiert und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Zur Isolation von T-Lymphozyten erfolgte die Entnahme des zöliakischen und portalen Lymphknotens (Barbier et al. 2012), die nach ihrer Entnahme sofort in einem mit Zellkulturmedium befülltem Röhrchen auf Eis gelagert wurden. Leber und Milz wurden entnommen und gewogen. Definierte Stücke des *Lobus sinister lateralis* und *medialis* der Leber (Abb. 4) wurden bis zur Paraffineinbettung etwa 24 Stunden in neutral gepufferter 10%iger Formalinlösung fixiert.

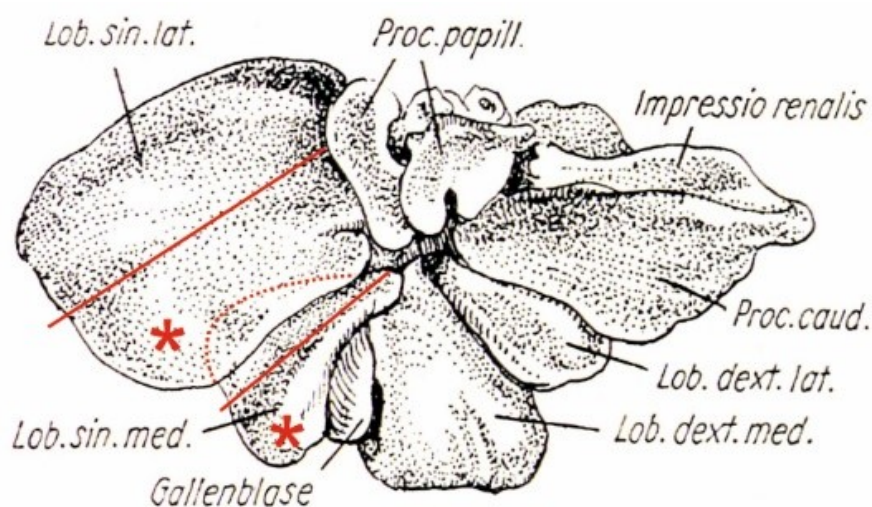


Abb. 4: Aufarbeitung der Leber der Maus (nach: Hoffmann & Bentz 1961, S. 213). Viszeralansicht. Mit einem Längsschnitt (durchgezogene, rote Linie) wurden der *Lobus sinister lateralis* und *medialis* halbiert. Die für die Paraffineinbettung verwendeten Stücke sind mit * markiert. Die unterbrochene, rote Linie deutet den verdeckten Verlauf des *Lobus sinister medialis* an.

3.4 ELISA

3.4.1 Nachweis von Antikörpern gegen lösliche Antigene des adulten *S. mansoni*-Wurms

3.4.1.1 Gewinnung von adulten Würmern

Für den Nachweis von Antikörpern gegen Antigene des adulten *S. mansoni*-Wurms wurde ein *soluble worm antigen preparation* (SWAP)-ELISA durchgeführt. Hierfür wurden *S. mansoni*-Würmer aus infizierten NMRI-Mäusen wie folgt isoliert: Zunächst wurden die NMRI-Mäuse mit einem intraperitoneal injizierten Betäubungsmittelgemisch ((8 mg Xylazin + 120 mg Ketamin + 8 mg Heparin)/kg KGW) narkotisiert. Das Töten der Mäuse erfolgte durch zervikale Dislokation. Nach Eröffnen des Brustkorbs und der Bauchhöhle wurde die Pfortader nahe der Hilusregion mit einer Schere horizontal durchtrennt. Zum Spülen des Lungen- und Körperkreislaufs wurde eine 20 ml-Spritze mit RPMI-1640 aufgezogen. Eine an der Spritze befestigte Butterfly-Kanüle wurde in die rechte Herzkammer eingestochen. Durch die retrograde Spülung des venösen Gefäßsystems wurden die in den großkalibrigen Lebervenen lebenden adulten Würmer herausgespült und in einem Becherglas aufgefangen. Der Inhalt des Becherglases wurde dann über ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) gegeben und die Würmer aufgefangen. Nach mehrfachem Waschen mit PBS (pH 7,4) wurden die adulten Würmer mithilfe eines Spritzenkolben durch das Zellsieb in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen gerieben und mechanisch zerkleinert. Mehrfach wurde das Sieb während des Vorgangs mit PBS pH 7,4 gespült. Dann wurde die Suspension eine Stunde lang bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus). Der Überstand wurde aliquotiert und die Aliquots bei -80°C eingefroren.

Die Konzentration des löslichen *S. mansoni*-Wurmantigens in den Aliquots wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Die Messungen wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Protein Assay Kit II) nach Herstellerinstruktionen durchgeführt. Die Eichgerade wurde unter Verwendung der ebenfalls im Kit enthaltenen BSA-Standardlösung erstellt. Die optische Dichte wurde bei 595 nm mit einem Mikrovolumenspektrometer (Colibri) gemessen.

3.4.1.2 Herstellung der SWAP-beschichteten Mikrotiterplatte

Bei der Messung der Konzentration von löslichem Wurmantigen ergab sich für die in dieser Arbeit verwendete Lösung ein Wert von 34 µg/ml. Die SWAP-haltige Lösung wurde mit Beschichtungspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt. Zur Beschichtung der Mikrotiterplatte wurden in die Vertiefungen jeweils 100 µl der Verdünnung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift (entspricht in diesem Abschnitt dreimaligem Waschen mit je 300 µl Waschpuffer). Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurde die Platte mit 300 µl Blocklösung für 30 min bei RT beschichtet. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift.

3.4.1.3 Durchführung des anti-SWAP-ELISAs

Die Mausseren wurden im Verhältnis 1:50 mit Waschpuffer verdünnt. 100 µl der Serumverdünnungen wurden in die Vertiefungen gegeben und eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen mit je 300 µl Waschpuffer. Danach wurde ein polyklonaler Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (*Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)*) 1:50000 mit Waschpuffer verdünnt. Je 100 µl der Verdünnung wurden in die Vertiefungen pipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µl TMB als Substrat in jede Kavität pipettiert und über 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Schließlich wurde die Farbreaktion mit 50 µl Stopplösung beendet und die optische Dichte mit einem automatischen Mikrotiterplatten-Photometer (Multiskan EX) durch die Endpunktmessung bei der spezifischen Wellenlänge von 450 nm abzüglich der Referenzwellenlänge von 620 nm bestimmt.

Die Analyse der Proben erfolgte mittels Doppelbestimmungen.

3.4.2 Nachweis von Antikörpern gegen das lösliche *S. mansoni*-Ei-Antigen

Zum Nachweis von *S. mansoni* spezifischen Antikörpern gegen lösliches Ei-Antigen (*soluble egg antigen, SEA*) wurden SEA-beschichtete ELISA-Streifen für den Nachweis in humanen Proben (*Schistosoma mansoni* IgG ELISA-Kit) mit Detektionsantikörpern gegen murine Immunglobuline kombiniert.

Die Mausseren wurden 1:100 in Probenpuffer, der im ELISA-Kit enthalten war, verdünnt. Anschließend wurden je 100 µl der vorverdünnten Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach folgte ein Waschschrift (entspricht in diesem Abschnitt zweimaligem Waschen mit je 200 µl Waschpuffer). Ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-Sekundärantikörper (*rabbit F(ab')₂ anti-mouse IgG*) wurde 1:1000 mit Probenpuffer verdünnt und je 100 µl der Verdünnung in die Vertiefungen pipettiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT. Daran schloss sich ein Waschschrift an. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl TMB-Substratlösung durchgeführt und nach 10 Minuten mit 100 µl Stopplösung beendet (beide Lösungen im Kit enthalten). Schließlich wurde die optische Dichte (OD) mit dem automatischen Mikrotiterplatten-Photometer (Milenia Kinetic Analyser) durch die Endpunktmessung bei der spezifischen Wellenlänge von 450 nm abzüglich der Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Doppelbestimmungen.

3.5 Serumbiochemie

Um Aussagen über das Ausmaß der Leber- und Gallengangsschädigung machen zu können, wurden die Werte der Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alkalischen Phosphatase (AP), des Cholesterols und des Gesamt-Bilirubins bestimmt. Die Messungen wurden vom Zentrallaboratorium des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

3.6 Leberhistologie

Standardisierte Leberstücke (siehe 3.3.5) wurden in neutral gepufferter 10%iger Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Daraufhin wurden 5 µm dicke Leberschnitte am Mikrotom angefertigt. Die Färbung der Schnitte erfolgte zum einen mit Hämatoxylin/Eosin (HE, [Tabelle 5](#)), zum anderen mit Sirius Red / Fast Green (SR, [Tabelle 6](#)).

Die HE-Färbung wird standardmäßig verwendet, um Gewebe- und Zellstrukturen übersichtlich darzustellen. Das Hämatoxylin führt zu einer blauen Färbung der basophilen Zellkerne, während Eosin die azidophilen zytoplasmatischen Proteine rot färbt. Kollagenfasern erscheinen rosa bis rot.

Die Sirius Red-/ Fast Green-Färbung dient speziell dem Anfärben von Kollagenfasern, die sich rot darstellen.

3.6.1 Mikroskopische Auszählung der Eier und der Eigranulome

Die Anzahl der *S. mansoni*-Eier und der mit diesen assoziierten Granulome wurde in den HE-gefärbten Leberschnitten unter Verwendung eines Lichtmikroskops (Axioplan 2) bestimmt. Für jedes Versuchstier wurden die im gesamten Leberschnitt sichtbaren Eier ausgezählt.

Bei der Auszählung der Granulome wurde eine Leukozytenansammlung von mindestens 20 deutlich voneinander abgrenzbaren Leukozyten als peripherer Granulomanschnitt gewertet, wenn innerhalb der Leukozytenansammlung kein Blutgefäßanschnitt erkennbar war. Diese Regel sollte vermeiden, dass unspezifische perivaskuläre Leukozytenansammlungen als Granulom gewertet werden. Weiterhin galten zentrale Schnitte mit einem sichtbaren Ei als ein einzelnes Granulom. Ebenso wurde ein Ei, das erkennbar von sich zum Granulom formierenden Entzündungszellen umgeben war, als Granulom gewertet. Eine Leukozytenansammlung galt auch dann als Granulom, wenn sie in ihrem Zentrum einen Gewebeausriss enthielt (Schneideartefakt), der eindeutig der Form eines Schistosomeneis entsprach. Große, konfluierende Granulome mit multiplen Eiern im Zentrum wurden als ein einzelnes Granulom gewertet. Wenn jedoch die Zentren zweier konfluierender Granulome durch einen Entzündungszellsaum sichtbar getrennt waren und sich die Granulome in weniger als der Hälfte ihres Umfangs berührten, wurden diese einzeln gezählt (nach Wagner 2002).

Anschließend wurden die Leberschnitte mithilfe eines mit einem Lichtmikroskop (Axio Imager M2) verbundenen Scanningtischs bei 100-facher Vergrößerung eingescannt, um ihre jeweilige Gesamtfläche mit der ImageJ-Software zu

berechnen. Damit konnte die Ei- beziehungsweise Granulomdichte bestimmt werden. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

3.6.2 Morphometrische Analyse der Granulomgröße

In den digitalisierten HE-Leberschnitten wurden bei 10 Mäusen pro Versuchsgruppe jeweils 15 zufällig gewählte Granulome mithilfe der ImageJ-Software ausgemessen.

3.6.3 Quantitative Analyse der fibrotischen Fläche

Mit ImageJ wurde die Gesamtfläche der SR-gefärbten Leberschnitte berechnet. Dazu wurde der Farbfilter des Programms mit Hue=0-255, Saturation=0-200 und Brightness=140-200 konfiguriert.

Anschließend wurde der Farbfilter so verändert, dass nur noch die rötlich erscheinenden fibrotischen Areale markiert waren (Hue=0-255, Saturation=30-200 und Brightness=140-200) und ausgemessen werden konnten.

3.7 Durchflusszytometrie

Vor der durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten der STR/ort- und C57BL/6-Mäuse mussten diejenigen Konzentrationen der in den folgenden Schritten verwendeten Antikörper ermittelt werden, die eine möglichst optimale Färbung und durchflusszytometrische Messung ermöglichten. Dazu wurden entsprechend der unter [3.7.1](#) und [3.7.2](#) beschriebenen Methode Einzelfärbungen mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen durchgeführt. Als Material dienten die portalen und zöliakischen Lymphknoten infizierter NMRI-Mäuse. Aus dieser Vorarbeit ergaben sich schließlich die in [Tabelle 2](#) angegebenen Antikörpervolumina / 100 μ l Zellsuspension.

3.7.1 Herstellung einer Zellsuspension aus den entnommenen Lymphknoten und Stimulation der Zytokinproduktion

Der portale und der zöliakische Lymphknoten wurden den Mäusen entnommen und in einem mit Zellkulturmedium befülltem Röhrchen auf Eis gelagert. Für beide Lymphknoten ist gezeigt worden, dass sie die Leber drainieren (Barbier et al.

2012). Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Lymphknoten unter sterilen Bedingungen auf ein 70 µm Zellsieb überführt und mit dem gummibeschichteten Ende eines Spritzenkolben in ein 50 ml Röhrchen gerieben. Um am Zellsieb haftende Zellen zu gewinnen, wurde das Sieb mit 10 ml Zellkulturmedium gespült. Mit einer Neubauer Zählkammer wurde die Anzahl der lebenden Zellen nach Trypanblau-Färbung bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Um eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml zu erreichen, wurden die Zellen in der entsprechenden Menge an T-Zellkulturmedium resuspendiert. Danach wurden 200 µl der Zellsuspension in die Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Durch Zugabe von 4 µl eines PMA und Ionomycin enthaltenden Zellstimulationsreagenz (*cell stimulation cocktail* (500x); 1:10 vorverdünnt mit Zellkulturmedium) wurden die T-Zellen aktiviert. Durch Zugabe von 2 µl Brefeldin A (1:10 vorverdünnt mit Zellkulturmedium) wurde die Zytokinsekretion der T-Zellen blockiert. Die Inkubation erfolgte 4,5 h bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre. Danach wurden die Zellen in 1,5 ml Röhrchen transferiert.

3.7.2 Färben der Oberflächenmarker und intrazellulären Zytokine

Die Zellen wurden 7 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert (in diesem Abschnitt der Arbeit mit der Zentrifuge Biofuge Fresco). Danach wurden sie in 95 µl FACS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl Mausnormalserum zur Absättigung der Fc-Rezeptoren für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit ausgewählten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD3, CD4 und CD8 (siehe [Tabelle 2](#) für jeweils hinzugefügte Antikörpervolumina) 15 min auf Eis inkubiert. Außerdem wurden Isotyp-Kontrollen für die Zytokinfärbung mitgeführt. Durch Waschen (Zentrifugation 3000 rpm, 7 min, 4°C) mit FACS-Puffer wurden ungebundene Antikörper entfernt.

Anschließend wurden die Sedimente in 500 µl einer PFA-Lösung 2% resuspendiert und zur Fixierung 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal in FACS-Puffer gewaschen (jeweils 3000 rpm, 7 min, 4°C). Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen in 95 µl Saponinpuffer resuspendiert und nach Zugabe von 5 µl Mausnormalserum 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden die in [Tabelle 2](#) angegebenen Antikörpervolumina zum

Anfärben von Interferon-gamma (IFN- γ), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-17A (IL-17A) bzw. die entsprechenden Isotypen hinzugefügt. Die Zellen wurden 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend gewaschen (3000 rpm, 7 min, 4°C) und in FACS-Puffer resuspendiert.

Vor der durchflusszytometrischen Analyse der ersten Proben erfolgte die Kompensation mit BD CompBeads Anti-Rat/Hamster Ig κ -Partikeln und BD CompBeads Negative Control-Partikeln nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Proben mit einem FACS Aria II und der zugehörigen Software (BD FACSDiva Software, Version 6.1.2) analysiert.

3.8 Statistische Analysen

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem D'Agostino & Pearson omnibus-Normalitätstest. Zum Vergleich mehrerer Mittelwerte aus normalverteilten Daten wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, erfolgte die Auswertung mit dem Mann-Whitney U-Test. Die Signifikanzniveaus sind in dieser Arbeit mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) und **** ($p < 0,0001$) angegeben.

Zur Fehlerkontrolle wurde die *false discovery rate* (FDR) unter Anwendung der explorativen Simes-Prozedur (Benjamini-Hochberg-Prozedur; Benjamini & Hochberg 1995) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Die C57BL/6- und STR/ort-Mäuse entwickelten durch die Infektion eine Hepatosplenomegalie

Zunächst interessierte uns, ob sich ein Effekt der Infektion auf das Körper-, Leber- und Milzgewicht der C57BL/6- und STR/ort-Mäuse nachweisen ließe. In unserem Tierversuch konnten wir zeigen, dass die Entwicklung des

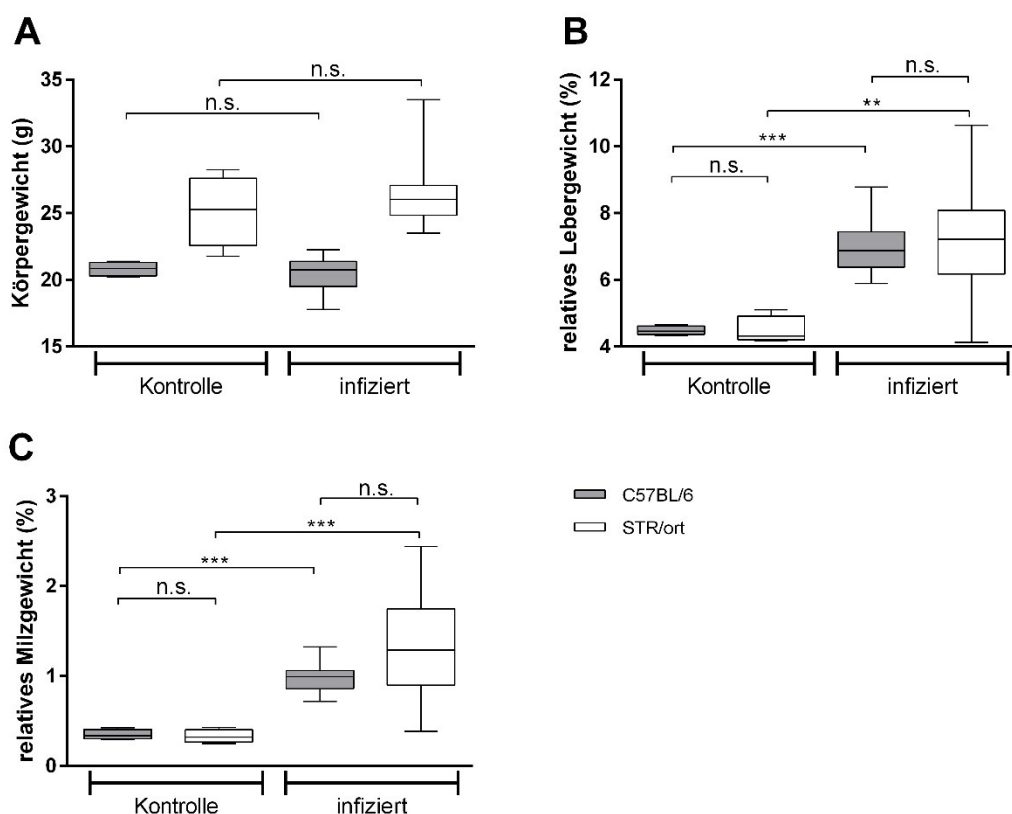


Abb. 5: Die STR/ort- und C57BL/6-Mäuse entwickelten durch die Infektion eine Hepatosplenomegalie in vergleichbarem Ausmaß. Alle Werte wurden am Tag der Organentnahme gemessen. Die Anzahl der Mäuse betrug in den Kontrollgruppen jeweils 4 und in den Versuchsgruppen jeweils 16. Die Entwicklung des Körpergewichts (A) war bei den infizierten und uninfizierten Mäusen innerhalb der Stämme vergleichbar. Das relative Lebergewicht (B) und das relative Milzgewicht (C) wiesen eine infektionsbedingte Erhöhung in beiden Stämmen auf ein vergleichbares Niveau auf. Die Boxen zeigen das 25%-, 75%-Quantil sowie den Median, die Whisker das 5%- bzw. das 95%-Quantil; Mann-Whitney U-Test. n.s. – nicht signifikant.

Körpergewichts bei den infizierten und uninfizierten Mäusen innerhalb der Stämme vergleichbar war (Abb. 5A).

Ein Vergleich der Mediane zeigte einen infektionsbedingten Anstieg des relativen Lebergewichts (Abb. 5B) von 4,46 auf 6,88 % bei den C57BL/6-Mäusen und von 4,33 auf 7,22 % bei den STR/ort-Mäusen. Das relative Milzgewicht (Abb. 5C) nahm von 0,34 auf 0,99 % im C57BL/6-Stamm und von 0,32 auf 1,30 % im STR/ort-Stamm zu. Damit stieg das relative Organgewicht von Leber und Milz in beiden Stämmen auf einen vergleichbaren Wert an.

4.2 Histologischer Nachweis und Ausmaß der Infektion

Zur Infektion wurde jede Maus 50 *S. mansoni*-Zerkarien im Sitzbad ausgesetzt. Um die Infektion nachzuweisen und Informationen zum Ausmaß der Infektion zu erhalten, wurden die Wurmeier und Granulome in den HE-Leberschnitten lichtmikroskopisch ausgezählt und ihre Dichte im Lebergewebe bestimmt. Außerdem wurden mittels ELISA die im Serum vorhandenen IgG-Titer gegen SWAP und SEA ermittelt.

4.2.1 Die Anzahl der Eier und Granulome in den Lebern war zwischen den C57BL/6- und STR/ort-Mäusen vergleichbar

Zwischen dem C57BL/6- und STR/ort-Stamm zeigte sich im Durchschnitt eine vergleichbare Anzahl an Eiern und Granulomen (Abb. 6). Die Auszählung der Eier ergab bei den C57BL/6-Mäusen im Mittel $0,53 \pm 0,05$ Eier / mm² Leberfläche,

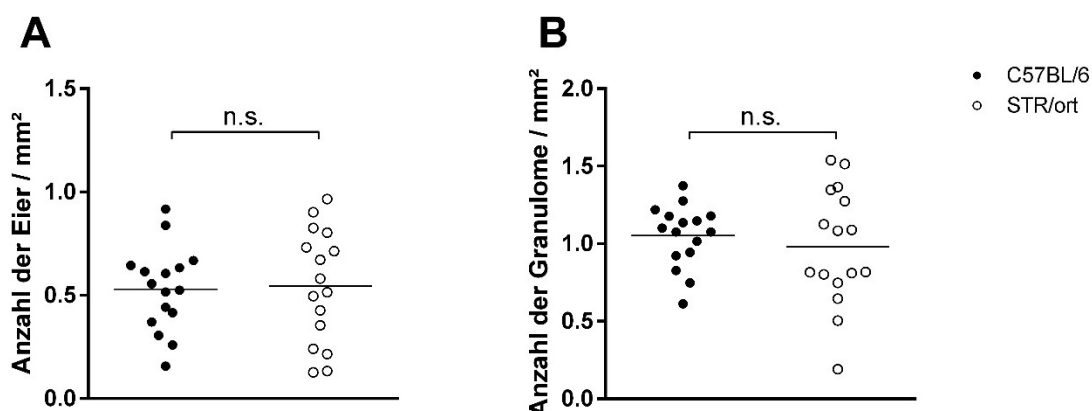


Abb. 6: Bei den infizierten STR/ort- und C57BL/6-Mäusen waren die Anzahl der Eier (A) und Granulome (B) in den Lebern vergleichbar. Die Auszählungen erfolgten lichtmikroskopisch bei 100-facher Vergrößerung an HE-Leberschnitten. Dargestellt sind die Mittelwerte; ungepaarter t-Test. n.s. – nicht signifikant.

während dieser Wert bei den STR/ort-Mäusen bei $0,54 \pm 0,07$ Eiern / mm^2 lag (Abb. 6A). Die Anzahl der Granulome / mm^2 betrug im C57BL/6-Stamm $1,05 \pm 0,05$ und im STR/ort-Stamm $0,98 \pm 0,09$ (Abb. 6C).

Bei 2 Tieren je Stamm konnten trotz des Sitzbads in zerkarienhaltigem Wasser keine Eier im HE-Schnitt der Leber nachgewiesen werden. Diese Tiere wurden von der Studie ausgeschlossen, um nur die Daten von Tieren mit histologisch gesicherter Infektion in die Ergebnisse einfließen zu lassen.

4.2.2 Die infizierten STR/ort- und C57BL/6-Mäuse zeigten vergleichbare IgG-Titer gegen SWAP und SEA

Die Mäuse des STR/ort-Stamms und die des C57BL/6-Stamms hatten 8 Wochen nach der Infektion mit *S. mansoni*-Zerkarien vergleichbare IgG-Titer gegen SWAP und SEA (Abb. 7). Im anti-SWAP-ELISA lag der Median der ODs bei 0,71 im C57BL/6-Stamm und bei 0,54 im STR/ort-Stamm. Im anti-SEA-ELISA ergab sich ein Median von 0,99 OD bei den C57BL/6-Mäusen und 0,90 OD bei den STR/ort-Mäusen. Die Werte der Kontrolltiere lagen im anti-SWAP-ELISA im Bereich von 0,077 bis 0,24 OD (n=4 je Stamm). Im anti-SEA-ELISA lag der Wert der Kontrolltiere bei 0,006 OD (n=1 je Stamm).

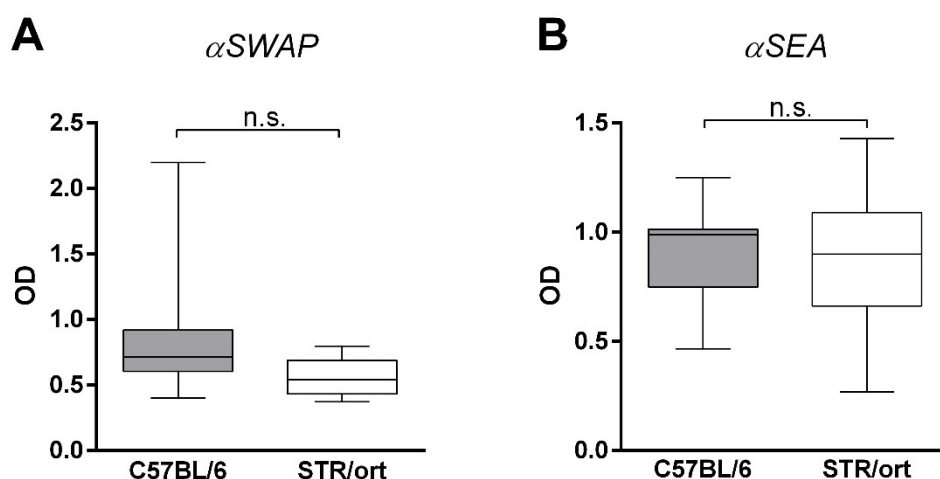


Abb. 7: Die infizierten C57BL/6- und STR/ort-Mäuse zeigten vergleichbare IgG-Titer gegen SWAP und SEA. Die Untersuchungen wurden mit 14 Seren infizierter STR/ort-Weibchen und 9 Seren infizierter C57BL/6-Weibchen mittels ELISA durchgeführt. Für die Analyse der anti-SWAP-Titer (A) wurden die Seren der Mäuse im Verhältnis 1:50 verdünnt. Die Werte aller Kontrolltiere (n=4 pro Stamm) lagen im Bereich von 0,077 bis 0,24 OD. Die Untersuchung der anti-SEA-Titer (B) erfolgte an 1:100 verdünnten Seren. Der Wert der Kontrolltiere lag bei 0,006 OD (n=1 je Stamm). Die Boxen zeigen das 25%-, 75%-Quantil sowie den Median der ODs, die Whisker das 5%- bzw. das 95%-Quantil; Mann-Whitney U-Test. n.s. – nicht signifikant.

4.3 Die Marker für eine hepatozelluläre Schädigung fielen im STR/ort-Stamm signifikant geringer aus als im C57BL/6-Stamm

Als Nächstes interessierte uns das Ausmaß des Leberschadens, der durch die *S. mansoni*-Infektion entstanden war. Erhöhungen der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) dienen als Hinweis auf eine hepatozelluläre Schädigung. Bei den C57BL/6-Mäusen zeigte sich infektionsbedingt ein signifikanter Anstieg der ALT im Vergleich zu den Kontrolltieren. Außerdem lagen die ALT-Werte der infizierten C57BL/6-Mäuse signifikant höher als die des STR/ort-Stamms. Bei den STR/ort-Mäusen zeigte sich kein signifikanter Anstieg der ALT im Vergleich zur Kontrolle ([Abb. 8A](#)). Bei der Messung der AST ergab sich ein signifikanter Anstieg nur im Serum der infizierten C57BL/6-Mäuse ([Abb. 8B](#)).

Die Alkalische Phosphatase wurde gemessen, da sie als klassisches Indikatorenzym für die Cholestase gilt. In dieser Studie zeigte sich ein vergleichbarer, signifikanter Abfall der AP-Werte durch die Infektion im STR/ort- und C57BL/6-Stamm ([Abb. 8C](#)).

Die infektionsbedingten Veränderungen des Cholesterolspiegels im Serum waren gegenläufig bei den Stämmen. Während die STR/ort-Mäuse durch die Infektion einen starken, signifikanten Abfall des Cholesterols zeigten, stieg bei den C57BL/6-Mäusen das Cholesterol signifikant an ([Abb. 8D](#)).

Da auch ein erhöhter Bilirubin-Wert durch ein cholestatisches Schädigungsmuster bedingt sein kann, wurde das Gesamt-Bilirubin bestimmt. Das Gesamt-Bilirubin stieg im Serum der infizierten C57BL/6-Weibchen signifikant an ([Abb. 8E](#)). Im Serum der STR/ort-Mäuse zeigte sich kein signifikanter Anstieg.

Zusammenfassend wies der STR/ort-Stamm im Vergleich mit dem C57BL/6-Stamm signifikant geringere ALT-Serumspiegel und tendenziell geringere AST-Spiegel auf, wodurch ein geringerer hepatozellulärer Schaden im STR/ort-Stamm

zu vermuten ist. Hinweise auf eine Cholestase als Resultat des Lebergewebeumbaus im Rahmen der Infektion ergaben sich nicht.

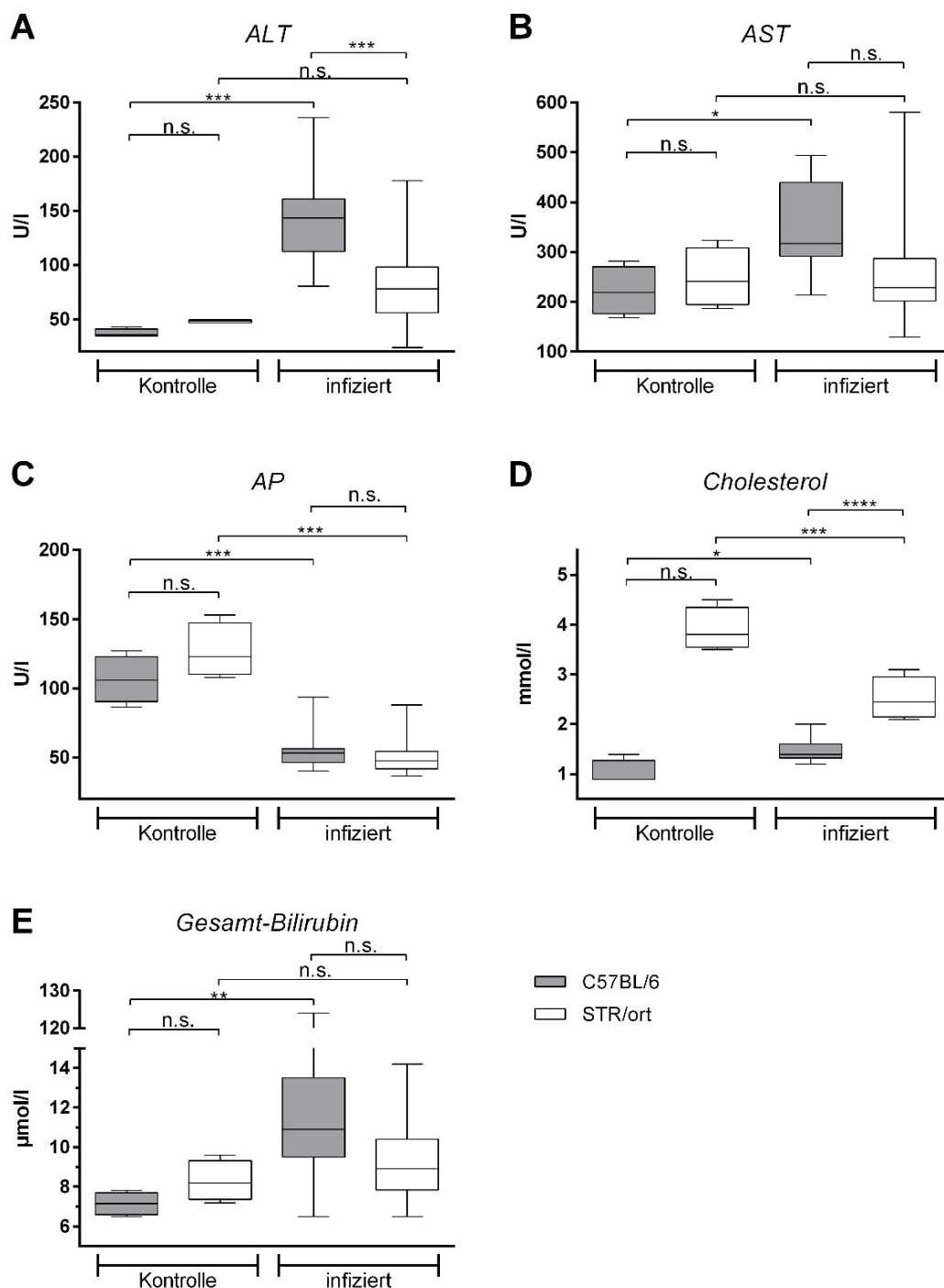


Abb. 8: Die STR/ort-Mäuse zeigten nach Infektion signifikant geringere ALT-Werte als die Mäuse des C57BL/6-Stamms und keinen Anstieg der AST-Werte. Im Serum der Mäuse wurden die Werte ALT (A), AST (B), AP (C), Cholesterol (D) und das Gesamt-Bilirubin (E) gemessen. Die Messung wurde pro Stamm an 16 Seren infizierter Mäuse und an 4 Seren uninfizierter Mäuse durchgeführt. Die Boxen zeigen das 25%-, 75%-Quantil sowie den Median der Konzentration, die Whisker das 5%- bzw. das 95%-Quantil; Mann-Whitney U-Test. n.s. – nicht signifikant. ALT = Alanin-Aminotransferase; AST = Aspartat-Aminotransferase; AP = alkalische Phosphatase.

4.4 Die STR/ort- und C57BL/6-Mäuse zeigten eine vergleichbare Größe hepatischer Granulome

Zur Quantifizierung des Ausmaßes der pathologischen Veränderungen in der Leber wurden zunächst die Größen der Eigranulome bestimmt. Dafür wurden die mit HE gefärbten Leberschnitte eingescannt und bei 10 Versuchstieren pro Stamm der Flächeninhalt von jeweils 15 zufällig gewählten Granulomen computergestützt gemessen. Dabei zeigten die Granulome des C57BL/6- und STR/ort-Stamms vergleichbare Granulomgrößen (mediane Granulomgröße von 56386 μm^2 im C57BL/6 und 68794 μm^2 im STR/ort-Stamm; [Abb. 9](#)).

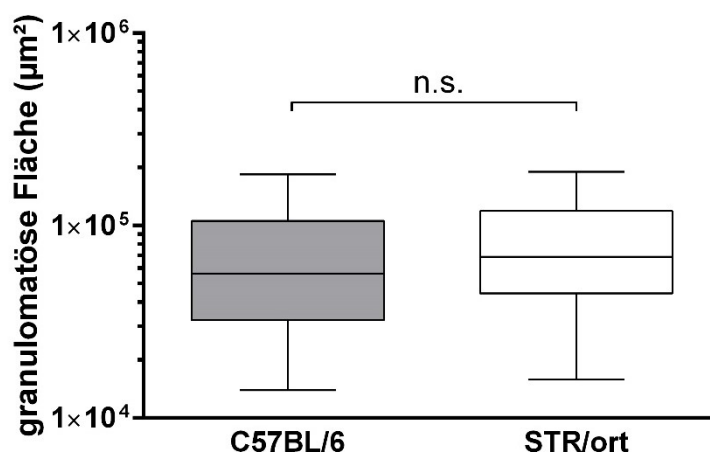


Abb. 9: Die Granulomgrößen waren im STR/ort- und C57BL/6-Stamm vergleichbar. Bei 10 Tieren je Versuchsgruppe wurden jeweils 15 zufällig gewählte Granulome computergestützt ausgemessen und so die durchschnittliche Granulomgröße ermittelt. Die Boxen zeigen das 25%- , 75%-Quantil sowie den Median der Granulomfläche eines Granuloms, die Whisker das 5%- bzw. das 95%-Quantil. n.s. – nicht signifikant.

4.5 Das Ausmaß der portalen Fibrosierung war bei den STR/ort- und C57BL/6-Mäusen vergleichbar

Um die Fibrosierung des Lebergewebes im Rahmen der Schistosomiasis quantifizieren zu können, wurden definierte Teile der paraffinierten Lebern mit Sirius Red gefärbt und computergestützt der Anteil der fibrotischen Fläche an der gesamten Fläche des Leberschnitts bestimmt (beispielhaft in [Abb. 10A](#) und [B](#)). Dabei zeigten die Lebern der Tiere beider Stämme 8 Wochen nach Infektion eine im Ausmaß vergleichbare portale Fibrose ([Abb. 10C](#)). Im C57BL/6-Stamm lag der Median des Fibroseausmaßes bei 19,15 %, im STR/ort-Stamm bei 15,22 %.

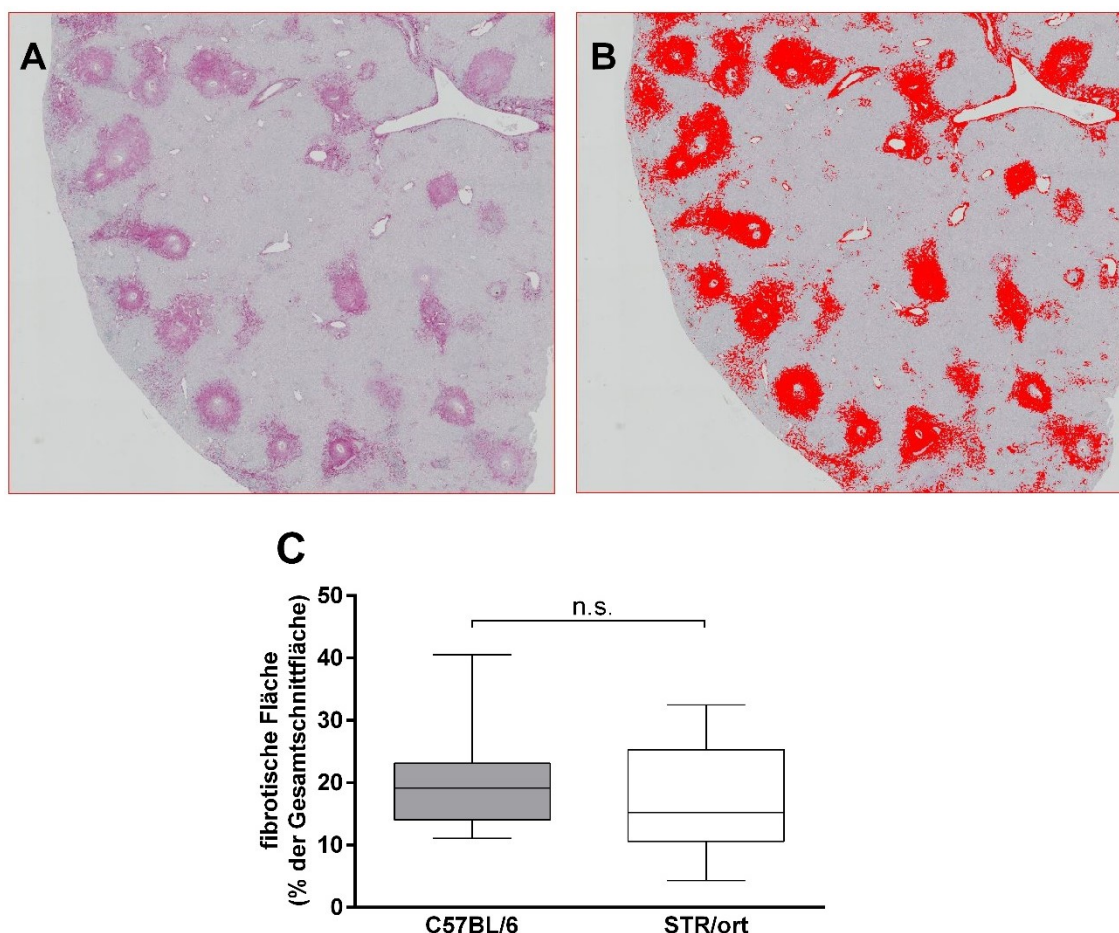


Abb. 10: Das Ausmaß der portalen Fibrosierung war bei den STR/ort- und C57BL/6-Mäusen vergleichbar. Definierte Teile der Lebern wurden mit Sirius Red gefärbt, die Schnitte wurden eingescannt und die fibrotischen Anteile mithilfe eines in ImageJ integrierten Farbfilters gemessen. Exemplarisch ist ein Ausschnitt eines gescannten Leberschnittes einer C57BL/6-Maus vor (A) und nach (B) Anwendung des Farbfilters bei 100-facher Vergrößerung abgebildet. Die Messung der fibrotischen Fläche eines Leberschnitts im Verhältnis zur Gesamtfläche des Leberschnitts ergab vergleichbare Werte in beiden Stämmen (C). Die Boxen zeigen das 25%-, 75%-Quantil sowie den Median der fibrotischen Fläche eines Leberschnitts, die Whisker das 5%- bzw. das 95%-Quantil. n.s. – nicht signifikant.

4.6 Die infizierten STR/ort-Mäuse wiesen einen geringeren Anteil IL-4- und IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten auf

Um Erklärungen für die unterschiedlich hohen Konzentrationen der von uns im Rahmen der Serumbiochemie gemessenen Werte zu finden, untersuchten wir die Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Lymphozyten, die sich in den die Leber drainierenden Lymphknoten befanden. Dazu wurden die CD4⁺ T-Zellen *in vitro* restimuliert, ihre intrazellulären Zytokine gefärbt und für jedes gemessene Zytokin der Anteil der zytokinpositiven CD4⁺ T-Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺

T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die durchflusszytometrische Analyse einer infizierten C57BL/6-Maus ist exemplarisch in [Abb. 11](#) dargestellt.

Bei den C57BL/6-Mäusen stieg der Medianwert des Anteils IFN- γ -positiver CD4⁺ T-Zellen im Rahmen der Infektion signifikant von 0,15 auf 1,7 % an. Die Mäuse des STR/ort-Stamms zeigten einen tendenziell geringeren, nicht signifikanten Anstieg von 0,4 auf 1,15 % ([Abb. 12A](#)). Der Anteil TNF- α -positiver CD4⁺ T-Lymphozyten sankt in beiden Stämmen nach der Infektion, und zeigte einen signifikanten Abfall der Medianwerte von 81,45 auf 63,05 % beim C57BL/6-Stamm und einen nicht signifikanten Abfall von 73,4 auf 51,95 % im STR/ort-Stamm ([Abb. 12B](#)). Weiterhin zeigte sich ein signifikant höherer Anteil IL-4-positiver und IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten bei den infizierten C57BL/6-Weibchen im Vergleich mit den infizierten STR/ort-Weibchen (Medianwerte IL-4: 2,9 % C57BL/6 vs. 1,65 % STR/ort; Medianwerte IL-10: 1,0 % C57BL/6 vs. 0,3 % STR/ort; [Abb. 12C](#) und [D](#)). Die Anteile der IL-17A-positiven CD4⁺ T-Zellen lagen bei den Kontrolltieren beider Stämme auf vergleichbarem Niveau, und es kam weder bei den STR/ort- noch bei den C57BL/6-Mäusen zu einem signifikanten, infektionsbedingten Anstieg der IL-17A-positiven CD4⁺ T-Lymphozyten (Daten nicht dargestellt).

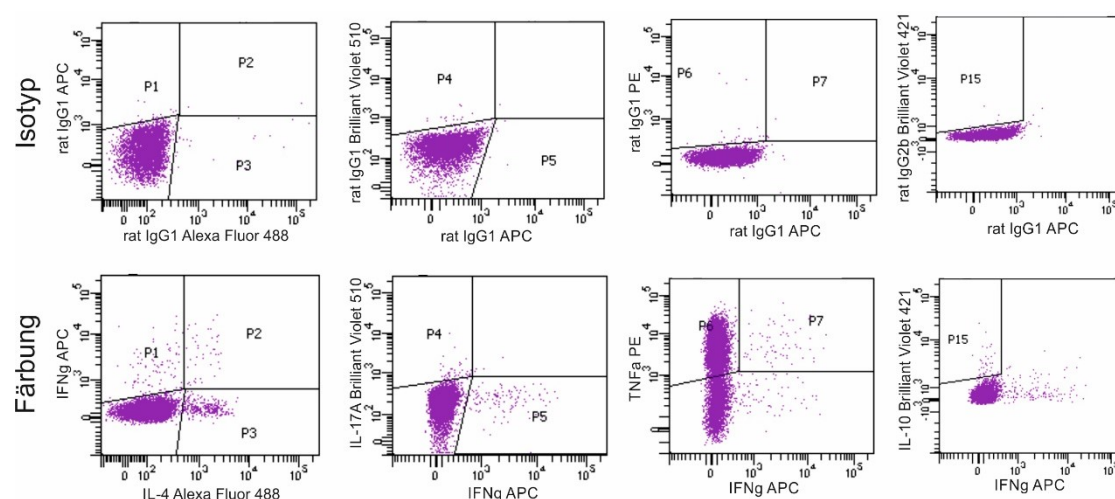


Abb. 11: Exemplarische Darstellung der Zytokinfärbung, der Isotypkontrolle sowie der Gating-Strategie bei einer infizierten C57BL/6-Maus. Nach der *in vitro* durchgeführten Restimulation der CD4⁺ T-Lymphozyten aus den Lymphknoten der infizierten Mäuse erfolgte zum einen die Zugabe von Antikörpern gegen ausgewählte intrazelluläre Zytokine und zum anderen die Anfertigung von Isotyp-Kontrollen. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert und Gates entsprechend dem in dieser Abbildung gezeigten Beispiel gesetzt.

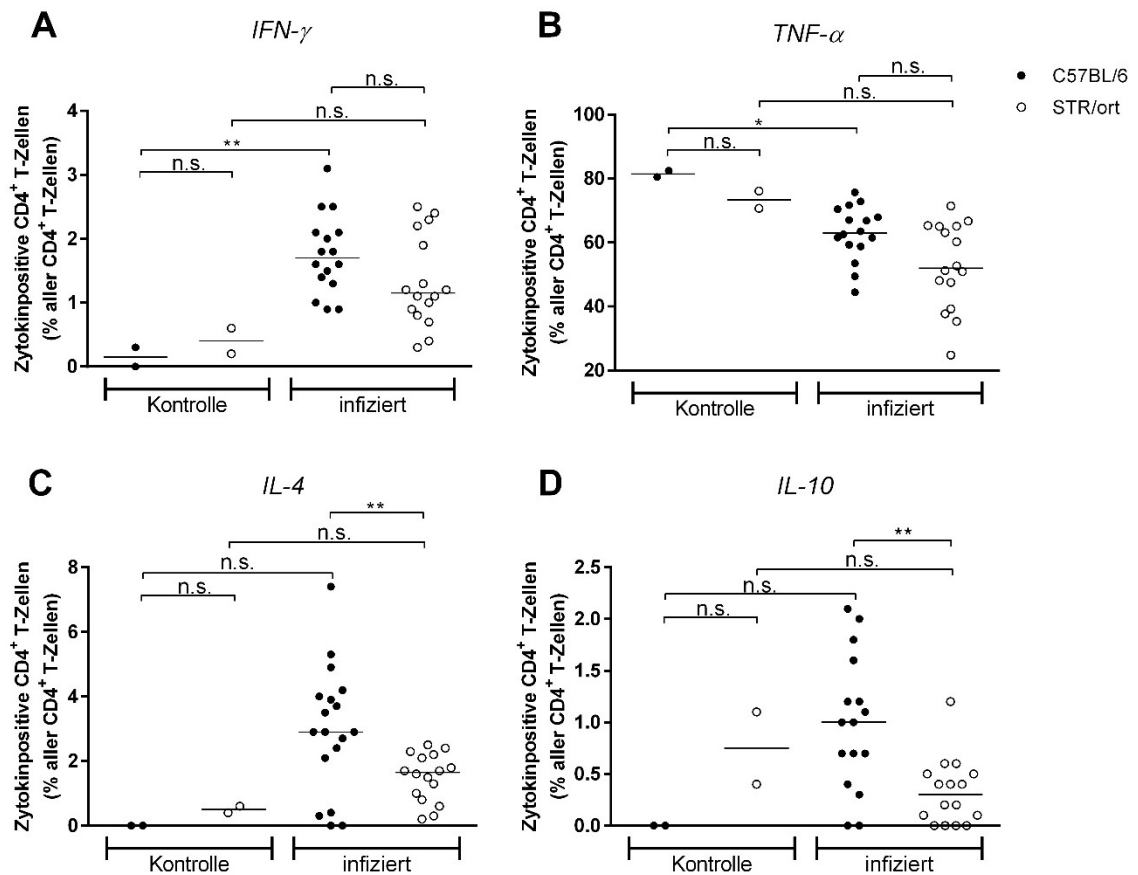


Abb. 12: Der Anteil IL-4- und IL-10-positiver CD4⁺ T-Zellen an allen CD4⁺ T-Zellen ist im STR/ort-Stamm signifikant geringer als im C57BL/6-Stamm. Die intrazelluläre Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Zellen wurde für die Zytokine IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-4 (C) und IL-10 (D) per Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist der Anteil der zytokinpositiven CD4⁺ T-Zellen in Bezug auf die Gesamtheit der detektierten CD4⁺ T-Zellen. Die Darstellung zeigt außerdem die Mediane der Werte. n.s. – nicht signifikant.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit weiblicher STR/ort-Mäuse zur immunologischen Abwehr einer *S. mansoni*-Infektion untersucht, indem die Antikörperproduktion, die Schwere der Krankheitsausprägungen und die Produktion von T-Zellzytokinen der STR/ort-Mäuse quantifiziert und die Ergebnisse mit denen infizierter C57BL/6-Mäuse verglichen wurden. Außerdem wurde der Einfluss einer hereditären Hyperlipidämie auf die Reproduktionsfähigkeit der Schistosomen anhand der Anzahl hepatischer Wurmeier untersucht.

Bei der Analyse der 16 STR/ort- und 16 C57BL/6-Weibchen ergaben sich in beiden Stämmen milde Ausprägungen der Erkrankung. Die Ei- und Granulomanzahl im Lebergewebe sowie die Höhe der gegen *S. mansoni* gerichteten Antikörper zeigte sich vergleichbar. Ebenso lagen die Granulomgröße und das Ausmaß der portalen Fibrosierung in beiden Stämmen auf ähnlichem Niveau.

Die im Serum gemessenen Marker für eine hepatozelluläre Schädigung fielen jedoch im STR/ort-Stamm signifikant geringer aus als im C57BL/6-Stamm. Zusätzlich wiesen die STR/ort-Weibchen geringere Anteile IFN- γ -, TNF- α -, IL-4- und IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten, die sich für die beiden letztgenannten Zytokine signifikant darstellten.

5.1 Trotz Hyperlipidämie keine erhöhte Eianzahl in den Leberschnitten der STR/ort-Mäuse im Vergleich mit den C57BL/6-Mäusen

Als Ergebnis der Auszählung zeigte sich 8 Wochen *post infectionem* eine vergleichbare Anzahl der Wurmeier im STR/ort- und C57BL/6-Stamm.

Alencar et al. (Alencar, Alba Cristina Miranda de Barros et al. 2009) beschrieben die Auswirkungen einer fettreichen Ernährung, die u.a. zu einer Hypercholesterinämie führte, auf den Verlauf einer Schistosomiasis bei Mäusen.

17 Wochen nach der Infektion mit *S. mansoni* (chronische Phase der Schistosomeninfektion) wurden den Mäusen die Organe entnommen und die Eianzahl pro Gramm Organgewicht bestimmt. In ihrer Studie fanden sie heraus, dass sich bei den fettreich ernährten Mäusen signifikant mehr Eier im Leber- und Darmgewebe nachweisen ließen als bei standardmäßig ernährten Mäusen. Sie vermuteten, dass die höheren Serumcholesterolspiegel über ungeklärte Signalwege zu einer vermehrten Eiproduktion in den weiblichen Würmern führten. Im Gegensatz dazu zeigten sich in einer anderen Studie, in der die Anzahl der im Darmgewebe verfangenen Schistosomeneier bei fettreich und standardmäßig ernährten Mäusen 9 Wochen *post infectionem* (Abklingen der akuten Phase / Beginn der Immunomodulation) ausgezählt worden waren, keine signifikanten Unterschiede (Neves et al. 2007). Dies ist insofern interessant, als sowohl in dieser Arbeit (Abb. 8) als auch von Uchida et al. (Uchida et al. 2009) bei STR/ort-Mäusen eine Hypercholesterinämie nachgewiesen werden konnte, sich jedoch in der vorliegenden Arbeit 8 Wochen *post infectionem* keine größere Eianzahl im Lebergewebe der STR/ort-Mäuse darstellte. Damit stimmen unsere Ergebnisse mit denen von Neves et al. (Neves et al. 2007) weitgehend überein. Es bleibt die Frage offen, ob die STR/ort-Mäuse bei einer längeren Infektionsdauer (bis in die chronische Phase der Infektion) aufgrund ihrer hereditären Hypercholesterinämie eine vergleichsweise erhöhte Eianzahl im Lebergewebe aufweisen würden.

Das Auszählen der Eier erfolgte anhand der HE-gefärbten Leberschnitte. Diese Methode ist einfach durchführbar und die Färbung führt nicht zur Auflösung oder starken Beschädigung der Eier. Alternativ stand eine von Cheever (Cheever 1968) beschriebene Methode zur Verfügung, bei der die Eianzahl nach Auflösung eines definierten Stücks der Mausleber mit Kalilauge ausgezählt und so die Eianzahl pro Gramm Lebergewicht ermittelt wird.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich in unserer Arbeit bei einer vergleichbaren Anzahl an in der Leber gefangenen Eiern im STR/ort- und C57BL/6-Stamm 8 Wochen nach Infektion kein Hinweis auf günstigere oder ungünstigere Lebens- und Reproduktionsbedingungen der Schistosomen in einem der Stämme zeigte. Ob die Hyperlipidämie der STR/ort-Stämme bei einer chronischen Infektion die parasitäre Reproduktion begünstigen könnte, wäre in einer anschließenden Studie zu klären.

5.2 Die Produktion von Antikörpern gegen SWAP und SEA

Bei den STR/ort- und C57BL/6-Mäusen zeigten sich 8 Wochen *post infectionem* vergleichbare IgG-Titer gegen SWAP und SEA, obwohl vorige Untersuchungen von Pasold eine Hypogammaglobulinämie der STR/ort-Mäuse aufgezeigt hatten (Abb. 3). Das Auftreten einer Hypogammaglobulinämie beim Menschen in Zusammenhang mit einer Osteopetrose wurde bereits von Guerrini et al. (Guerrini et al. 2008) beschrieben. Die Autoren untersuchten zwei Geschwister, die an osteoklastenarmer autosomal-rezessiver Osteopetrose erkrankt waren, und wiesen einen Defekt im RANK-codierenden Gen (TNFRSF11A) nach. Diese Patienten zeigten eine Hypogammaglobulinämie, die mit einer partiellen Störung der B-Zellreifung assoziiert war. Die Monozyten der Patienten waren *in vitro* nicht in der Lage, in Gegenwart von M-CSF und RANKL zu Osteoklasten zu differenzieren. Hingegen konnten Pasold et al. nachweisen, dass Knochenmarkszellen von STR/ort-Mäusen in Gegenwart von M-CSF und RANKL zu Osteoklasten differenzieren können, wenn auch in deutlich geringerer Zahl als im C57BL/6-Stamm (Pasold et al. 2013). Da die STR/ort-Mäuse außerdem nicht an dem bei RANK-defizienten Mäusen typischerweise fehlenden Durchbruch der Zähne leiden, kann ein Defekt des RANK-codierenden Gens als Ursache der Hypogammaglobulinämie bei uninfizierten STR/ort-Mäusen ausgeschlossen werden.

Wie können wir dann erklären, dass trotz der beschriebenen Hypogammaglobulinämie die Antikörpertiter gegen *S. mansoni*-Antigene in der STR/ort-Maus mit denen von C57BL/6-Tieren vergleichbar sind? Eine Möglichkeit wäre, dass aufgrund der Hyperostose weniger räumliche Nischen im Knochenmark existieren, in denen Plasmazellen langfristig überleben können. Die Folge wäre, dass in der Peripherie zwar immer wieder neue Plasmablasten und Plasmazellen entstehen und dafür sorgen, dass aktuell benötigte Antikörper vorliegen. Da die Plasmazellen im Knochenmark aber keine Überlebensnische finden, gehen sie mittelfristig zugrunde und führen zu einem in der Gesamtheit verminderten IgG-Titer.

Weiterhin ist festzustellen, dass sich mit unseren Untersuchungen nicht abschließend beantworten lässt, ob der Antikörperklassenwechsel von IgM zu IgG im STR/ort-Stamm verzögert abläuft. Dieser Frage könnte aber in einem

zukünftigen Projekt mit engmaschiger Kontrolle der IgM- und IgG-Titer im Verlauf einer Infektionskrankheit, wie beispielsweise der Schistosomiasis, nachgegangen werden.

5.3 Ausbildung einer Hepatosplenomegalie nach der Infektion

Eine beständige Eigenschaft der Schistosomiasis in immunkompetenten Wirten ist die Entwicklung einer Hepatosplenomegalie (Brunet et al. 1999; Richter & Ruppel 2010). Sowohl im STR/ort- als auch im C57BL/6-Stamm führte die Infektion mit *S. mansoni* zur Ausbildung einer Hepatosplenomegalie, während sich das Körpergewicht durch die Infektion nicht signifikant veränderte.

Brunet et al. (Brunet et al. 1999) beschäftigten sich mit der Rolle der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die Teil der Th1-gewichteten Immunreaktion gegen die Schistosomeninfektion ist. Sie konnten zeigen, dass die Blockade der iNOS zur Kachexie der Mäuse und einer deutlich reduzierten Hepatosplenomegalie führte. Im Umkehrschluss könnte die in dieser Studie aufgetretene, in beiden Stämmen ähnlich ausgeprägte Hepatosplenomegalie als Hinweis auf eine vergleichbare Immunkompetenz gewertet werden.

5.4 Geringere hepatozelluläre Schädigung im STR/ort-Stamm

In vorangegangenen Studien konnte bei mit *S. mansoni* infizierten Mäusen ein Anstieg von AST und ALT im Serum nachgewiesen werden (El Shenawy et al. 2008). In unserer Studie ergaben die Messungen der ALT bei den infizierten C57BL/6-Mäusen einen Anstieg auf den 4-fachen Wert im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle, während sich bei den STR/ort-Mäusen ein nicht signifikanter Anstieg auf den 1,6-fachen Wert zeigte. Die AST zeigte sich ausschließlich bei den infizierten C57BL/6-Mäusen signifikant auf den 1,4-fachen Wert der uninfizierten Tiere erhöht.

Bei einer Infektion von C57BL/6-Mäusen mit 25 Zerkarien konnte eine Verdopplung des ALT-Werts 8 Wochen nach Infektion festgestellt werden (Hassanein et al. 1999). In Anbetracht der Anzahl von 50 Zerkarien, die wir zur

Infektion der Mäuse genutzt haben, scheint der von uns gemessene Anstieg auf den 4-fachen Wert plausibel.

Brunet et al. untersuchten die Plasmaspiegel der AST bei infizierten C57BL/6-Mäusen und stellten etwa 4,5-fach erhöhte Werte im Vergleich mit uninfizierten Mäusen fest. Allerdings wurden die Mäuse in ihrer Studie mit mehr Zerkarien infiziert (ca. 70 Zerkarien). Außerdem könnte der Unterschied zu unseren Ergebnissen in einer früheren Aufarbeitung (46 Tage nach Infektion) bei Brunet et al. begründet sein, da zu diesem Zeitpunkt die proinflammatorische Th1-Antwort noch deutlich ausgeprägter ist (Stadecker et al. 2004). In einer anderen Arbeit, in der C57BL/6-Weibchen mit 70 Zerkarien infiziert wurden, hatte sich der AST-Wert 56 Tage nach Infektion verdoppelt und nähert sich damit dem von uns ermittelten Wert an (Marshall et al. 1999).

Da die Werte der uninfizierten Mäuse des C57BL/6- und des STR/ort-Stamms auf ähnlichem Niveau liegen, ist es unwahrscheinlich, dass bei den Mäusen beider Stämme wesentlich unterschiedliche Transaminasenkonzentrationen in den Körperzellen vorliegen. Weil es infolge der Infektion jedoch zu einer deutlich geringeren Erhöhung der Transaminasen im STR/ort-Stamm kommt, ist davon auszugehen, dass der infektionsbedingte hepatozelluläre Schaden im STR/ort-Stamm geringer ist. Bei einer vergleichbaren Anzahl der im Lebergewebe gefangenen Schistosomeneier ist dies am ehesten durch eine geringere granulomatöse Entzündungsreaktion im periovulären Gewebe zu erklären.

Schließlich erschien uns ein potentieller Zusammenhang der Hypercholesterinämie der STR/ort-Mäuse mit der Leberschädigung in diesem Stamm als diskussionswürdig. Am interessantesten wirkte bei der Literaturrecherche ein Zusammenhang zwischen Cholesterolspiegel und hepatischer Schädigung im Rahmen einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH), die Teil des Spektrums der nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) ist und mit Fettleibigkeit, Diabetes mellitus Typ 2, Hyperlipidämie und anderen Merkmalen des metabolischen Syndroms assoziiert ist (Eslami et al. 2013). Während die genauen molekularen Mechanismen, die die Entstehung einer NASH fördern, noch unklar bleiben, gibt es Hinweise, dass freies Cholesterol in der Leber als lipotoxisches Molekül die Entwicklung einer NASH wesentlich fördern kann (Ioannou 2016). Als Ausdruck einer Entzündung der Fettleber sind für die NASH chronisch erhöhte ALT- und AST-Werte

charakteristisch (Eslami et al. 2013). In Bezug auf den hyperlipidämischen STR/ort-Stamm scheint die Entwicklung einer NASH jedoch keine Rolle zu spielen. Zum einen findet sich aktuell keine Literatur, die die Entwicklung einer NAFLD oder NASH bei den STR/ort-Mäusen beschreibt. Lediglich Uchida et al. (Uchida et al. 2009) berichten, dass sich bei den STR/ort-Mäusen keine exzessive Triglyceridansammlung in der Leber nachweisen lässt. Zum anderen lagen die Werte der Transaminasen im STR/ort-Stamm nicht oberhalb, sondern unterhalb der Werte im C57BL/6-Stamm.

Zusammenfassend zeigten sich in unserer Studie plausible infektionsbedingte Erhöhungen der Transaminasen ALT und AST, die in ähnlichem Ausmaß bereits in vorigen Studien berichtet worden waren. Der vergleichsweise geringere Anstieg der Transaminasen im STR/ort-Stamm geht am ehesten auf eine verringerte periovuläre Entzündungsreaktion zurück. Durch die Hyperlipidämie im STR/ort-Stamm wäre eher noch eine Erhöhung der Transaminasen im Rahmen einer nichtalkoholischen Steatohepatitis zu erwarten gewesen. Aufgrund der gemessenen erniedrigten Transaminasenwerte im STR/ort-Stamm konnte diese Annahme jedoch widerlegt werden.

5.5 Die Cholestaseparameter

Während in der Literatur beschrieben wird, dass es im Rahmen der Schistosomeninfektion zu einem geringen bis mäßigen Anstieg der Cholestasemarkern (hauptsächlich AP und Bilirubin) kommen kann (Richter & Ruppel 2010; Lammers et al. 2014; El Shenawy et al. 2008), zeigte sich in der von uns durchgeführten Studie ein deutlicher Abfall des AP-Werts bei den STR/ort- und C57BL/6-Mäusen. Dieses Phänomen ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben, zeigte sich jedoch wiederholt in unserem Labor und ist noch nicht erklärbar. Bei der Messung der AP wurden laut Labor alle Isoenzyme berücksichtigt.

Das Gesamt-Bilirubin hingegen zeigte nur im C57BL/6-Stamm einen infektionsbedingten Anstieg, vermutlich aufgrund narbiger Strikturen kleiner intrahepatischer Gallengänge. Dass es im STR/ort-Stamm nicht zu einer Erhöhung des Bilirubins kam, könnte als weiterer Hinweis dafür gewertet werden,

dass die Schädigung der Leber bzw. der Gallengänge in STR/ort-Stamm geringer ausgeprägt ist als im C57BL/6-Stamm.

Auch das Cholesterol wurde als – wenngleich zweitrangiger – Cholestaseparameter im Serum gemessen. Bei der Messung trat jedoch im STR/ort-Stamm ein Phänomen auf, dass Doenhoff et al. (Doenhoff et al. 2002) bereits bei fettreich ernährten Mäusen, die mit *S. mansoni* infiziert wurden, beschrieben haben. Während die fettreich ernährten Mäuse vor der Infektion etwa doppelt so hohe Cholesterinspiegel im Serum aufwiesen wie standardmäßig ernährte Mäuse, sanken die Werte der fettreich ernährten nach der Infektion und erreichten schließlich die Werte der Mäuse, die Standardkost erhielten. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Infektion auch bei STR/ort-Mäusen, also einem Mausmodell mit einer hereditären Hypercholesterinämie (Uchida et al. 2009), zu einer Senkung des Cholesterols im Serum führt.

Dass im Gegensatz zur Senkung im STR/ort-Stamm eine leichte Erhöhung des Cholesterolspiegels im C57BL/6-Stamm auftrat, könnte darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Stamm bei normaler Ernährung keine Hypercholesterinämie auftritt und daher der den Cholesterinspiegel senkende Effekt der Schistosomeninfektion kaum von Bedeutung ist. Stattdessen ließe sich der leichte Cholesterolanstieg auf narbige Strikturen kleiner intrahepatischer Gallengangäste zurückführen.

Insgesamt deutet nichts darauf hin, dass eine ausgeprägte Cholestase vorliegen würde.

5.6 Vergleichbare Krankheitsausprägungen wie im C57BL/6-Stamm weisen STR/ort-Mäuse als Vertreter der Stämme mit geringer Krankheitsausprägung aus

Die Analyse verschiedener Mausmodelle einer Schistosomeninfektion hat ergeben, dass sich von Stamm zu Stamm sehr unterschiedliche Immunantworten und Krankheitsausprägungen zeigen (Stadecker et al. 2004). Stämme mit schwerer Krankheitsausprägung der Schistosomiasis (z.B. C3H und CBA) weisen große, unzureichend begrenzte Granulome, eine starke parenchymale

Entzündung sowie eine ausgeprägte Splenomegalie auf, während andere Stämme mit geringer Krankheitsausprägung (z.B. C57BL/6 und BALB/c) kleinere Granulome, eine moderate Entzündung und Splenomegalie präsentieren (Stadecker et al. 2004). Obwohl die Gründe für die unterschiedlich schweren Krankheitsausprägungen der Schistosomiasis in den verschiedenen Mausstämmen nur unzureichend bekannt sind, konnten diverse Parameter identifiziert werden, die mit milden oder schweren Krankheitsausprägungen der murinen Schistosomiasis assoziiert sind. Eine wesentliche Rolle scheint der H-2-Haplotyp des Mausstamms zu spielen. Bei C3H- und CBA-Mäusen, die beide schwere Krankheitsausprägungen zeigen, liegt ein H-2^k-Haplotyp vor. Als Vertreter der Stämme mit leichten Krankheitsausprägungen tragen BALB/c-Mäuse den H-2^d-Haplotypen (Stadecker et al. 2004) und C57BL/6-Mäuse den H-2^b-Haplotypen (Jaeger et al. 2008). Man konnte zeigen, dass das *S. mansoni*-p40-Antigen (Sm-p40), welches der häufigste Bestandteil des *S. mansoni*-Eis ist, bei H-2^k-Mäusen eine starke CD4⁺ T-Zellantwort induziert, die sich Th1-polarisiert darstellt. Bei Nicht-H-2^k-Mäusen fallen hingegen die T-Zellantwort auf Sm-p40 und damit einhergehend die Krankheitsausprägungen deutlich geringer aus (Stadecker et al. 2004). Weiterhin zeigen Mäuse mit geringer Krankheitsausprägung einen geringeren Anteil CD4⁺ T-Lymphozyten an der Lymphozytenpopulation in den Granulomen und den drainierenden Lymphknoten als Mäuse mit schwerer Krankheitsausprägung (Rutitzky et al. 2001). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass ein größerer Anteil der CD4⁺ T-Lymphozyten in den Granulomen und Lymphknoten des C57BL/6-Stamms Apoptose begeht als im CBA-Stamm und dadurch die Entzündung günstig beeinflusst wird. Die erhöhte Apoptoserate war dabei mit einer geringen Produktion von IL-2 und somit einem Wachstumsfaktorentzug verbunden (Rutitzky et al. 2003). Eine hohe Apoptoserate der CD4⁺ T-Lymphozyten könnte auch im STR/ort-Stamm zu einer geringeren Entzündung des Leberparenchyms führen, wodurch die geringeren Transaminasenwerte zu erklären wären. Ob auch im STR/ort-Stamm ein Zusammenhang von erhöhter Apoptoserate der CD4⁺ T-Lymphozyten und einem Wachstumsfaktorentzug, insbesondere IL-2, besteht, müsste in künftigen Studien untersucht werden.

In unserer Studie ergab die Analyse der Granulomgrößen vergleichbare Werte bei STR/ort- und C57BL/6-Mäusen. Die Regulierung der Granulomgröße stellt einen komplexen Vorgang mit vielen Einflussfaktoren dar. Neben IL-2, IL-4 und weiteren Faktoren beeinflusst auch IL-10 die Granulomgröße. So wiesen IL-10-behandelte Mäuse kleinere Granulome und IL-10-defiziente Mäuse während der akuten Phase der Erkrankung größere Granulome auf. Weiterhin zeigte sich bei der Behandlung immunkompetenter Mäuse mit anti-TNF- α -Serum eine Abnahme der Granulomgröße (Allam 2007).

Martins et al. (Martins et al. 2014) maßen in ihrer Studie Granulomgrößen von durchschnittlich etwa 200 000 μm^2 , was mehr als der doppelten Größe der in dieser Studie gemessenen Granulome entspricht. Allerdings gingen Martins et al. methodisch anders vor, indem sie nämlich bei ihren Messungen nur Granulome mit einem gut definierten, einzelnen Ei berücksichtigten. Nach dieser Methode gingen Smith et al. (Smith et al. 2009) ebenfalls vor, die bei C57BL/6-Mäusen Granulome von durchschnittlich etwa 140 000 μm^2 nach einer Infektion mit 85 Zerkarien maßen. Allerdings bedeutet eine Beschränkung der Messungen auf Granulome mit nur einem erkennbaren Ei auch einen erheblichen Selektionsvorgang, weshalb wir in unserer Studie bei der Definition von Entzündungszellansammlungen als Granulom großzügiger vorgehen (siehe [3.6.1](#)). Die durchschnittlich kleineren Granulomgrößen in der von uns durchgeführten Studie erklären sich dadurch, dass auch periphere Granulomanschnitte als Granulom gewertet und gemessen wurden.

Eine Beeinflussung der Granulomgröße durch die Hyperlipidämie der STR/ort-Mäuse war nicht zu erwarten gewesen. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass Mäuse mit einer durch fettreiche Ernährung erzeugten Hyperlipidämie ähnliche Granulomgrößen aufwiesen wie standardmäßig ernährte Mäuse (Neves et al. 2007).

Auch das Ausmaß der portalen Fibrose zeigte sich vergleichbar im STR/ort- und C57BL/6-Stamm.

Im Vergleich mit dem C3H-Stamm, der bei einer Schistosomiasis eine starke Fibrosierung des Lebergewebes zeigt, ist der Fibrosegrad im C57BL/6-Stamm deutlich geringer. Eine schwere Leberfibrose korreliert dabei mit einer hohen IL-

13- und einer geringen IFN- γ - und IL-10-mRNA-Expression (Chiaramonte et al. 2001).

Für die Messung des Ausmaßes der Fibrose standen uns verschiedene Methoden zur Verfügung. Beispielsweise hätte die Quantifizierung des Fibrosegrades über Hydroxyprolinmessungen eine Möglichkeit dargestellt (Chiaramonte et al. 2001; Wilson et al. 2010; Reiman et al. 2006). Wir entschieden uns allerdings für eine schnelle und einfache Methode, die McDonald et al. im Mausmodell einer *Schistosoma japonicum*-Infektion überzeugend angewendet hatten (McDonald et al. 2010). Sie nutzten eine Software mit Farbfilter, um computergestützt den Fibrosegrad mit Sirius Red gefärbter Leberschnitte zu quantifizieren.

Da die STR/ort-Mäuse vergleichbare Granulomgrößen und Ausprägungen der hepatischen Fibrosierung wie die C57BL/6-Mäuse und außerdem sogar geringere Serummarker des hepatozellulären Schadens nach Infektion aufwiesen, lassen sich die weiblichen STR/ort-Mäuse der Gruppe der Mausmodelle einer Schistosomiasis mit geringer Krankheitsausprägung zuordnen. Diese Zuordnung lässt sich ferner dadurch stützen, dass STR/ort-Mäuse den gleichen H-2^b-Haplotypen wie C57BL/6-Mäuse tragen (Jaeger et al. 2008).

5.7 Der Einfluss des Zytokinmilieus auf die Krankheitsausprägungen der infizierten STR/ort-Mäuse

Die Ursachen dafür, dass verschiedene Mausstämme trotz gleicher Infektionslast deutlich unterschiedliche Krankheitsausprägungen der Schistosomiasis zeigen, sind erst teilweise bekannt (Rutitzky et al. 2003). Interessanterweise zeigen C57BL/6-Mäuse, die zur Gruppe der Stämme mit geringer Krankheitsausprägung gehören, nach SEA-Exposition eine kurze Th1-dominante Zytokinantwort, die in kurzer Zeit einer Th2-dominanten Antwort weicht (Stadecker & Hernandez 1998). Hingegen zeigen CBA-Mäuse als Vertreter der Stämme mit schwerer Krankheitsausprägung eine fortbestehende Th1-Antwort trotz der Entwicklung eines Th2-typischen Zytokinmilieus (Hernandez et al. 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die der Th1-Antwort zugeordneten Zytokine (IFN- γ , TNF- α) 8 Wochen nach Infektion im STR/ort-Stamm in gleichem Ausmaß produziert werden wie im C57BL/6-Stamm bzw. tendenziell sogar eine vergleichsweise geringere Produktion dieser Zytokine stattfindet. Dies spricht gegen die Persistenz einer Th1-Antwort und unterstützt damit die Hypothese, dass es sich beim STR/ort-Stamm nicht um einen Stamm mit schwerer Krankheitsausprägung handelt.

Die Messungen der Zytokine, die der Th2-Antwort zugerechnet werden (IL-4, IL-10), ergaben signifikant geringere Mengen zytokinpositiver CD4⁺ T-Lymphozyten im STR/ort-Stamm verglichen mit dem C57BL/6-Stamm. In früheren Untersuchungen konnte durch die *S. mansoni*-Infektion gendefizienter Mäuse die essentielle Schutzfunktion der Th2-Zytokine vor ausufernden Krankheitsausprägungen nachgewiesen werden (Ndlovu & Brombacher 2014). IL-4-defiziente Mäuse wurden mit Beginn der Eiablage der adulten Würmer kachektisch und gingen zugrunde. Dabei zeigten sie erhöhte Werte der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α sowie 5-fach erhöhte AST-Werte als Zeichen eines vermehrten hepatischen Schadens (Brunet et al. 1997; Fallon et al. 2000). Aufgrund der in unserer Studie gemessenen Werte – insbesondere eines ausbleibenden Anstiegs der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α – ist davon auszugehen, dass die Produktion von IL-4 und das Ausmaß der Th2-Antwort im STR/ort-Stamm ausreichen, um die Mäuse vor einem schweren Erkrankungsverlauf im Rahmen einer persistierenden Th1-Antwort zu schützen.

IL-10 ist von besonderem Interesse, da es eine wesentliche regulatorische Rolle bei der Schistosomeninfektion spielt und einen deutlichen Anteil an der Immunomodulation hat, die zu einer geringeren Reaktionsempfindlichkeit der T-Zellen auf Schistosomenantigene führt (Stadecker et al. 2004). Da der STR/ort-Stamm von allen gemessenen Zytokinen vergleichsweise geringe Mengen produziert, stellt sich die Frage, ob die Begründung dafür in einer generell verringerten T-Lymphozytenaktivität oder –empfindlichkeit zu finden ist. Prendergast et al. beschrieben verschiedene Faktoren, die zu einer herabgesetzten immunologischen Reagibilität auf fremde Antigene führen (Prendergast et al. 2015). Dabei unterschieden sie zwischen intrinsischen

Faktoren der antigenspezifischen CD4⁺ T-Lymphozytenpopulation (z.B. Anergie, Erschöpfung, Apoptose) und extrinsischen Faktoren (z.B. Inhibition durch regulatorische T-Lymphozyten oder IL-10). Eine starke Immunomodulation infolge hoher IL-10-Spiegel als Ursache einer verringerten T-Lymphozytenaktivität erscheint aufgrund des von uns gemessenen geringen Anteils IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten in den STR/ort-Weibchen unwahrscheinlich. Allerdings wird nicht das gesamte IL-10 von CD4⁺ T-Lymphozyten produziert. Hesse et al. (Hesse et al. 2004) konnten zeigen, dass auch Nicht-CD4-positive Zellen, beispielsweise B-Lymphozyten (Moore et al. 1993), einen entscheidenden Beitrag zur IL-10-Produktion leisten. Diese zusätzlichen IL-10-Quellen könnten zum milden Krankheitsverlauf im STR/ort-Stamm beitragen. Weitere Faktoren wie eine erhöhte Apoptoserate in den perioovulären Granulomen oder der Einfluss regulatorischer T-Lymphozyten sollten in künftigen Studien geklärt werden.

Bemerkenswert ist schließlich, dass sich in einer Studie mit uninfizierten STR/ort- und CBA-Mäusen signifikant erhöhte Zytokinkonzentrationen im Serum der STR/ort-Mäuse nachweisen ließen, u.a. IL-4, IL-5 und IL-10 sowie IFN- γ (Kyostio-Moore et al. 2011). Den Untersuchern ging es in ihrer Studie um die Zusammenhänge von Konzentrationen lokaler und systemischer Entzündungsmarker und der Entwicklung einer Kniegelenksarthrose. Da das Auftreten einer Kniegelenksarthrose jedoch deutlich häufiger bei männlichen STR/ort-Mäusen vorkommt (Mason et al. 2001), verwendeten sie – im Gegensatz zu uns – männliche Tiere. Es stellt sich die Frage, ob auch die STR/ort-Männchen im Falle einer *S. mansoni*-Infektion eine ähnlich milde granulomatöse Entzündungsreaktion wie die Weibchen zeigen würden, oder ob die erhöhten Zytokinkonzentrationen im Serum die Krankheitsausprägungen der Schistosomiasis signifikant fördern würden.

Zusammenfassend zeigten die weiblichen STR/ort-Mäuse signifikant geringere Anteile IL-4- und IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten als die C57BL/6-Mäuse sowie zusätzlich tendenziell erniedrigte Anteile der IFN- γ - und TNF- α -positiven CD4⁺ T-Zellen. Im Zusammenhang mit den geringeren Werten der ALT und AST 8 Wochen *post infectionem* lässt sich eine insgesamt verringerte Reagibilität der CD4⁺ T-Lymphozyten vermuten, die zu einer geringeren perioovulären Entzündungsreaktion führt. Ob eher intrinsische oder extrinsische Faktoren für

eine verringerte T-Zellaktivität im STR/ort-Stamm die entscheidende Rolle spielen, sollte Gegenstand künftiger Studien werden.

5.8 Einfluss der Hypercholesterinämie der STR/Ort-Mäuse auf die Zytokin- und Antikörperproduktion

Besonders Studien, die die Entstehung von Atherosklerose erforschen, beschäftigen sich mit dem Zusammenwirken einer Hypercholesterinämie und einer chronischen Entzündungsreaktion. Dies liegt vor allem daran, dass man heutzutage Atherosklerose als chronische Entzündung versteht, die in vielen Fällen durch eine Hypercholesterinämie initiiert und verstärkt wird (Jawien 2008). Ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenese ist die Autoimmunreaktion gegen *oxidiertes low-density lipoprotein* (oxLDL) durch T-Zellen sowie die Antikörperproduktion gegen diverse Epitope oxidierter LDL-Spezies, beispielsweise malondialdehyd-modifiziertes LDL (MDA-LDL).

Studien mit apoE^{-/-}-Mäusen, einem beliebten Atherosklerose-Mausmodell, ergaben, dass bei diesen Mäusen der vorherrschende Subtyp der MDA-LDL-spezifischen IgGs das IgG2a ist, welches hauptsächlich unter Einfluss IFN- γ -produzierender Th1-Zellen produziert wird. Mit ernährungsbedingt zunehmender Hypercholesterinämie zeigte sich eine Verschiebung zu einer Th2-Antwort, die mit einer vermehrten IL-4- und IL-10-Produktion, IgG1-Antikörperproduktion sowie abnehmender IgG2a-Produktion assoziiert war (Robertson et al. 2004). Dieser Zusammenhang einer Hypercholesterinämie mit der Th2-dominanten Zytokin- und Antikörperproduktion zeigte sich sowohl bei der Immunreaktion auf Autoantigene wie auch exogene Antigene. Allerdings lagen die Cholesterolserumspiegel der apoE^{-/-}-Mäuse, bei denen eine Verschiebung zur Th2-Antwort deutlich wurde, etwa beim 20-fachen der Werte des STR/ort-Stamms in unserer Studie (Robertson et al. 2004). Darüber hinaus würde eine Verschiebung zu einer Th2-dominanten Immunantwort noch immer keine Erklärung für die tendenziell geringeren Anteile IFN- γ - und TNF- α -positiver sowie die signifikant geringeren Anteile IL-4- und IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten im STR/ort-Stamm im Vergleich mit dem C57BL/6-Stamm liefern. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass der direkte Einfluss der genetisch bedingten

Hyperlipidämie der STR/ort-Mäuse auf die granulomatöse Entzündungsreaktion während der Schistosomeninfektion eher als gering einzuschätzen ist.

5.9 Zusammenfassende Schlussbetrachtung der Ergebnisse

Im Folgenden sollen die im Rahmen meiner Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der anfangs festgelegten Fragestellungen zusammengefasst werden.

Zeigt sich 8 Wochen *post infectionem* – insbesondere aufgrund der genetisch bedingten Hyperlipidämie der STR/ort-Mäuse – im STR/ort-Stamm eine erhöhte Eianzahl im Lebergewebe im Vergleich zum C57BL/6-Stamm?

Die STR/ort-Mäuse, deren Merkmal eine genetisch bedingte Hypercholesterinämie und Hypertriglyceridämie ist, zeigten in unserer Studie auf dem Höhepunkt der akuten Phase der Schistosomeninfektion (8. Woche *post infectionem*) keine erhöhte Ei- oder Granulomanzahl im Lebergewebe im Vergleich mit den C57BL/6-Mäusen. Dies steht im Einklang mit vorigen Untersuchungen, bei denen sich gezeigt hatte, dass fettreich ernährte Mäuse zwar noch nicht während des Abklingens der akuten Phase der Schistosomeninfektion, jedoch während der chronischen Phase der Infektion eine signifikant erhöhte Anzahl an Eiern im Leber- bzw. Darmgewebe aufwiesen (Neves et al. 2007; Alencar, Alba Cristina Miranda de Barros et al. 2009). Die Autoren betrachteten die erhöhten Cholesterolspiegel der fettreich ernährten Mäuse in ihrer Studie als begünstigenden Faktor einer gesteigerten Reproduktion der Schistosomen. Es bleibt die Frage offen, ob die STR/ort-Mäuse bei einer längeren Infektionsdauer (bis in die chronische Phase der Infektion) aufgrund ihrer hereditären Hypercholesterinämie eine vergleichsweise erhöhte Eianzahl im Lebergewebe aufweisen würden.

Zeigt der STR/ort-Stamm eine schwächere Antikörperproduktion gegen *S. mansoni*-Antigene als der C57BL/6-Stamm?

Obwohl in Voruntersuchungen an uninfizierten Mäusen niedrigere IgG-Titer in STR/ort-Mausseren als in C57BL/6-Mausseren gefunden worden waren, zeigten

sich bei den infizierten Tieren in dieser Arbeit vergleichbare IgG-Titer gegen SWAP und SEA in beiden Stämmen. Dies weist darauf hin, dass die STR/ort-Mäuse im Fall einer Antigenpräsentation sehr wohl dazu fähig sind, 8 Wochen *post infectionem* in ähnlichem Maße wie C57BL/6-Mäuse IgG-Antikörper zu synthetisieren. Ob der Antikörperklassenwechsel von IgM zu IgG im STR/ort-Stamm verzögert abläuft, lässt sich mit unseren Untersuchungen nicht abschließend beantworten. Dieser Frage könnte aber in einem zukünftigen Projekt mit engmaschiger Kontrolle der IgM- und IgG-Titer im Verlauf einer Infektionskrankheit, wie beispielsweise der Schistosomiasis, nachgegangen werden.

Zeigen sich im STR/ort-Stamm schwerere Organschäden und – veränderungen (hepatozellulärer Schaden, Granulomgrößen, hepatische Fibrose, Körper- und Organgewicht) nach der *S. mansoni*-Infektion als im C57BL/6-Stamm?

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass insgesamt eher das Gegenteil zutrifft. Die niedrigeren Werte der Transaminasen ALT und AST (signifikant für ALT) weisen auf einen geringeren hepatozellulären Schaden der STR/ort-Mäuse im Vergleich mit den C57BL/6-Mäusen hin. Bei der Untersuchung der Granulome zeigten sich jedoch umschrieben dar und wiesen vergleichbare Größen auf (mediane Granulomgröße von 56386 μm^2 im C57BL/6 und 68794 μm^2 im STR/ort-Stamm). Daher sind die niedrigeren Werte der Transaminasen im STR/ort-Stamm vermutlich durch eine schwächere granulomatöse Entzündungsreaktion zu erklären, aus der ein geringerer Leberparenchymschaden als bei den C57BL/6-Mäusen resultiert. Eine limitierte entzündliche Komponente der Immunantwort der STR/ort-Mäuse ist also im Rahmen der Schistosomeninfektion als vorteilhaft zu betrachten.

Die mit der granulomatösen Entzündung einhergehende Fibrosierung des Gewebes, das das Schistosomenei umgibt, zeigte sich in beiden Stämmen auf vergleichbarem Niveau. Als entscheidender Mediator der Fibrosierung hat sich IL-13 herausgestellt (Chiaramonte et al. 2001). Es ist anzunehmen, dass IL-13 in den STR/ort- und C57BL/6-Mäusen in vergleichbarer Menge produziert wird.

Ein Vergleich der Körper- und Organgewichte der STR/ort- und C57BL/6-Mäuse zeigte, dass beide Stämme infektionsbedingt eine vergleichbare

Hepatosplenomegalie entwickelt hatten. Ein rascher Körpergewichtsverlust, wie er bei IL-4-defizienten und IL-4-/IL-10-defizienten Mäusen mit Beginn der Eiablage auftritt (Brunet et al. 1997; Hoffmann et al. 2000), konnte ebenfalls in beiden Stämmen ausgeschlossen werden. Keine Maus verstarb vor Ablauf der Studiendauer.

Welche Zusammenhänge zwischen den Krankheitsausprägungen der STR/ort- und C57BL/6-Mäuse und der jeweiligen Zytokinproduktion der CD4⁺-T-Lymphozyten lassen sich aufzeigen?

Der Anteil IL-4- und IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten fällt im STR/ort-Stamm signifikant geringer aus, was zunächst auf eine schwächere Th2-Antwort der STR/ort-Mäuse im Vergleich mit den C57BL/6-Mäusen hindeutet. Allerdings fehlt der Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ - und TNF- α im STR/ort-Stamm, welcher als Ausdruck einer Th1-polarisierten Immunantwort zu erwarten gewesen wäre (Hoffmann et al. 2000). Hingegen ist tendenziell auch der Anteil der IFN- γ - und TNF- α -positiven CD4⁺ T-Lymphozyten im STR/ort-Stamm erniedrigt. Diese fehlende Th1-Persistenz rechtfertigt unter Berücksichtigung der eher geringen pathologischen Veränderungen die Zuordnung des STR/ort-Stamms zu den Stämmen mit milden Krankheitsausprägungen bei *S. mansoni*-Infektion, zu denen auch C57BL/6-Mäuse gerechnet werden.

Verallgemeinert lässt sich sagen, dass das Profil der von uns gemessenen Zytokine des STR/ort-Stamms dem der C57BL/6-Mäuse – wahrscheinlich auch aufgrund des gleichen H-2^b-Haplotypen – ähnelt, insgesamt jedoch die Zytokinproduktion sowohl Th1- als auch Th2-assoziiierter Zytokine im STR/ort-Stamm geringer als im C57BL/6-Stamm zu sein scheint. Dieser Punkt könnte entscheidend sein für die geringere granulomatöse Entzündungsreaktion, die vermutlich für den vergleichsweise kleineren hepatozellulären Schaden im STR/ort-Stamm verantwortlich ist.

Verschiedene Ursachen für eine abgeschwächte Immunantwort auf fremde Antigene sind bekannt. Dazu zählen intrinsische Faktoren der antigenspezifischen CD4⁺ T-Lymphozytenpopulation (z.B. Anergie, Erschöpfung, Apoptose) und extrinsische Faktoren (z.B. Inhibition durch regulatorische T-Lymphozyten oder IL-10) (Prendergast et al. 2015). Eine starke Immunomodulation infolge hoher IL-10-Spiegel als Ursache eines verringerten

immunologischen Ansprechens erscheint aufgrund des von uns gemessenen geringen Anteils IL-10-positiver CD4⁺ T-Lymphozyten in den STR/ort-Weibchen unwahrscheinlich. Allerdings wird nicht das gesamte IL-10 von CD4⁺ T-Lymphozyten produziert. Hesse et al. (Hesse et al. 2004) konnten zeigen, dass auch Nicht-CD4-positive Zellen, beispielsweise B-Lymphozyten (Moore et al. 1993), einen entscheidenden Beitrag zur IL-10-Produktion leisten. Diese zusätzlichen IL-10-Quellen könnten zum milden Krankheitsverlauf im STR/ort-Stamm beitragen. Von daher ist eine abschließende Klärung, welche intrinsischen und extrinsischen Faktoren in welchem Ausmaß für die präsentierte Immunantwort der STR/ort-Mäuse verantwortlich sind, in dieser Studie nicht möglich und könnte damit das Ziel weiterer Studien sein.

Abschließend ist festzuhalten, dass durch unsere Untersuchungen die Hypothese eines schwereren Krankheitsverlaufs bei *S. mansoni*-infizierten STR/ort-Mäusen im Vergleich mit C57BL/6-Mäusen widerlegt wurde. Die STR/ort-Mäuse sollten ebenfalls den Stämmen mit geringer Krankheitsausprägung zugerechnet werden, wie es bereits mit den C57BL/6-Mäusen geschehen ist.

6 Literaturverzeichnis

- Alencar, Alba Cristina Miranda de Barros, Neves, R.H., Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Gomes, D.C., Machado-Silva, J.R. (2009): High fat diet has a prominent effect upon the course of chronic schistosomiasis mansoni in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 608–613.
- Allam, G. (2007): Vasoactive intestinal peptide inhibits liver pathology in acute murine schistosomiasis mansoni and modulates IL-10, IL-12 and TNF-alpha production. *Immunobiology* 212, 603–612.
- Barbier, L., Tay, S.S., McGuffog, C., Triccas, J.A., McCaughan, G.W., Bowen, D.G., Bertolino, P. (2012): Two lymph nodes draining the mouse liver are the preferential site of DC migration and T cell activation. *Journal of hepatology* 57, 352–358.
- Barron, L., Wynn, T.A. (2011): Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *European journal of immunology* 41, 2509–2514.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995): Controlling the false discovery rate a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 57, 289.
- Blin-Wakkach, C., Wakkach, A., Sexton, P.M., Rochet, N., Carle, G.F. (2004): Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. *Leukemia* 18, 1505–1511.
- Braschi, S., Wilson, R. (2006): Proteins Exposed at the Adult Schistosome Surface Revealed by Biotinylation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 5, 347–356.
- Brunet, L., Beall, M., Dunne, D.W., Pearce, E.J. (1999): Nitric Oxide and the Th2 Response Combine to Prevent Severe Hepatic Damage During *Schistosoma mansoni* Infection. *The journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists* 163, 4976–4984.

- Brunet, L.R., Finkelman, F.D., Cheever, A.W., Kopf, M.A., Pearce, E.J. (1997): IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 159, 777–785.
- Cheever, A.W. (1968): Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bulletin of the World Health Organization* 39, 328–331.
- Chiaromonte, M.G., Cheever, A.W., Malley, J.D., Donaldson, D.D., Wynn, T.A. (2001): Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 34, 273–282.
- Chuah, C., Jones, M.K., Burke, M.L., McManus, D.P., Gobert, G.N. (2014): Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in parasitology* 30, 141–150.
- Del Fattore, A., Cappariello, A., Teti, A. (2008): Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone* 42, 19–29.
- Doenhoff, M.J., Stanley, R.G., Griffiths, K., Jackson, C.L. (2002): An anti-atherogenic effect of *Schistosoma mansoni* infections in mice associated with a parasite-induced lowering of blood total cholesterol. *Parasitology* 125, 415–421.
- Dougall, W.C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., Smedt, T. de, Daro, E., Smith, J., Tometsko, M.E., Maliszewski, C.R., Armstrong, A., Shen, V., Bain, S., Cosman, D., Anderson, D., Morrissey, P.J., Peschon, J.J., Schuh, J. (1999): RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes & development* 13, 2412–2424.
- El Shenawy, N.S., Soliman, M.F.M., Reyad, S.I. (2008): The effect of antioxidant properties of aqueous garlic extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agents in mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50, 29–36.
- Eslami, L., Merat, S., Malekzadeh, R., Nasser-Moghaddam, S., Aramin, H. (2013): Statins for non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *The Cochrane database of systematic reviews* 12, CD008623.

- Fallon, P.G., Richardson, E.J., McKenzie, G.J., McKenzie, A.N. (2000): Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 164, 2585–2591.
- Guerrini, M.M., Sobacchi, C., Cassani, B., Abinun, M., Kilic, S.S., Pangrazio, A., Moratto, D., Mazzolari, E., Clayton-Smith, J., Orchard, P., Coxon, F.P., Helfrich, M.H., Crockett, J.C., Mellis, D., Vellodi, A., Tezcan, I., Notarangelo, L.D., Rogers, M.J., Vezzoni, P., Villa, A., Frattini, A. (2008): Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *American journal of human genetics* 83, 64–76.
- Hassanein, H., Kamel, M., Badawy, A., El-Ghorab, N., Abdeen, H., Zada, S., El-Ahwany, E., Doughty, B. (1999): Anti-miracidial effect of recombinant glutathione S-transferase 26 and soluble egg antigen on immune responses in murine schistosomiasis mansoni. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 107, 723–736.
- Hernandez, H.J., Edson, C.M., Harn, D.A., Ianelli, C.J., Stadecker, M.J. (1998): *Schistosoma mansoni*: genetic restriction and cytokine profile of the CD4 + T helper cell response to dominant epitope peptide of major egg antigen Sm-p40. *Experimental parasitology* 90, 122–130.
- Hesse, M., Piccirillo, C.A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., Cheever, A.W., Shevach, E.M., Wynn, T.A. (2004): The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 172, 3157–3166.
- Hoffmann, G., Bentz, H. (1961): *Abriß der Laboratoriumstierkunde*. Jena: Fischer.
- Hoffmann, K.F., Cheever, A.W., Wynn, T.A. (2000): IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 164, 6406–6416.
- Ioannou, G.N. (2016): The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 27, 84–95.

- Jaeger, K., Selent, C., Jaehme, W., Mahr, S., Goebel, U., Ibrahim, S., Vollmar, B., Mueller-Hilke, B. (2008): The genetics of osteoarthritis in STR/ort mice. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 16, 607–614.
- Jawien, J. (2008): New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 118, 127–131.
- Kyostio-Moore, S., Nambiar, B., Hutto, E., Ewing, P.J., Piraino, S., Berthelette, P., Sookdeo, C., Matthews, G., Armentano, D. (2011): STR/ort mice, a model for spontaneous osteoarthritis, exhibit elevated levels of both local and systemic inflammatory markers. *Comparative medicine* 61, 346–355.
- Lammers, W.J., Kowdley, K.V., van Buuren, H.R. (2014): Predicting outcome in primary biliary cirrhosis. *Annals of hepatology* 13, 316–326.
- Marshall, A.J., Brunet, L.R., van Gessel, Y., Alcaraz, A., Bliss, S.K., Pearce, E.J., Denkers, E.Y. (1999): *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* Synergize to Promote Hepatocyte Dysfunction Associated with High Levels of Plasma TNF- α and Early Death in C57BL-6 Mice. *The journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists* 163, 2089–2097.
- Martins, V.P., Morais, S.B., Pinheiro, C.S., Assis, N.R.G., Figueiredo, B.C.P., Ricci, N.D., Alves-Silva, J., Caliar, M.V., Oliveira, S.C. (2014): Sm10.3, a member of the micro-exon gene 4 (MEG-4) family, induces erythrocyte agglutination in vitro and partially protects vaccinated mice against *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e2750.
- Mason, R.M., Chambers, M.G., Flannelly, J., Gaffen, J.D., Dudhia, J., Bayliss, M.T. (2001): The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 9, 85–91.
- McDonald, C.J., Jones, M.K., Wallace, D.F., Summerville, L., Nawaratna, S., Subramaniam, V.N. (2010): Increased iron stores correlate with worse disease outcomes in a mouse model of schistosomiasis infection. *PLoS ONE* 5, e9594.
- Moore, K.W., O'Garra, A., Waal Malefijt, R.d., Vieira, P., Mosmann, T.R. (1993): INTERLEUKIN-10. *Annual review of immunology* 11 (1993), 165–190.

- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.-L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N., Wynn, T.A. (2014): Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41, 14–20.
- Ndlovu, H., Brombacher, F. (2014): Role of IL-4R α during acute schistosomiasis in mice. *Parasite immunology* 36, 421–427.
- Neves, R.H., Miranda de Barros Alencar, Alba Cristina, Costa-Silva, M., Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Machado-Silva, J.R., Gomes, D.C. (2007): Long-term feeding a high-fat diet causes histological and parasitological effects on murine schistosomiasis mansoni outcome. *Experimental parasitology* 115, 324–332.
- Pasold, J., Engelmann, R., Keller, J., Joost, S., Marshall, R.P., Frerich, B., Müller-Hilke, B. (2013): High bone mass in the STR/ort mouse results from increased bone formation and impaired bone resorption and is associated with extramedullary hematopoiesis. *Journal of bone and mineral metabolism* 31, 71–81.
- Pearce, E.J., MacDonald, A.S. (2002): The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews. Immunology* 2, 499–511.
- Prendergast, C.T., Sanin, D.E., Cook, P.C., Mountford, A.P. (2015): CD4⁺ T cell hyporesponsiveness after repeated exposure to *Schistosoma mansoni* larvae is dependent upon interleukin-10. *Infection and immunity* 83, 1418–1430.
- Reiman, R.M., Thompson, R.W., Feng, C.G., Hari, D., Knight, R., Cheever, A.W., Rosenberg, H.F., Wynn, T.A. (2006): Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and immunity* 74, 1471–1479.
- Richter, J., Ruppel, A. (2010): Schistosomiasis oder Bilharziose. In: Löscher, T., Burchard, G.-D., Lang, W., Bendick, C. (Hg.): *Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Mit Reise- und Migrationsmedizin ; 287 Tabellen ; [mit Online-Zusatzmaterial]*. 4., komplett überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.

- Robertson, A.K., Zhou, X., Strandvik, B., Hansson, G.K. (2004): Severe hypercholesterolaemia leads to strong Th2 responses to an exogenous antigen. *Scandinavian journal of immunology* 59, 285–293.
- Rutitzky, L.I., Hernandez, H.J., Stadecker, M.J. (2001): Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13243–13248.
- Rutitzky, L.I., Hernandez, H.J., Yim, Y.-S., Ricklan, D.E., Finger, E., Mohan, C., Peter, I., Wakeland, E.K., Stadecker, M.J. (2005a): Enhanced egg-induced immunopathology correlates with high IFN-gamma in murine schistosomiasis: identification of two epistatic genetic intervals. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174, 435–440.
- Rutitzky, L.I., Lopes da Rosa, Jessica R, Stadecker, M.J. (2005b): Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175, 3920–3926.
- Rutitzky, L.I., Mirkin, G.A., Stadecker, M.J. (2003): Apoptosis by neglect of CD4+ Th cells in granulomas: a novel effector mechanism involved in the control of egg-induced immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 171, 1859–1867.
- Rutitzky, L.I., Stadecker, M.J. (2011): Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . *European journal of immunology* 41, 2677–2687.
- Sadler, C., Rutitzky, L., Stadecker, M., Wilson, R. (2003): IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. *European journal of immunology* 33, 880–888.
- Smith, P.M., Shainheit, M.G., Bazzone, L.E., Rutitzky, L.I., Poltorak, A., Stadecker, M.J. (2009): Genetic control of severe egg-induced immunopathology and IL-17 production in murine schistosomiasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183, 3317–3323.

- Stadecker, M.J., Asahi, H., Finger, E., Hernandez, H.J., Rutitzky, L.I., Sun, J. (2004): The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol. Rev.* 201, 168–179.
- Stadecker, M.J., Hernandez, H.J. (1998): The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. *Parasite immunology* 20, 217–221.
- Stadecker, M.J., Hernandez, H.J., Asahi, H. (2001): The identification and characterization of new immunogenic egg components: implications for evaluation and control of the immunopathogenic T cell response in schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 Suppl, 29–33.
- Uchida, K., Urabe, K., Naruse, K., Kozai, Y., Onuma, K., Mikuni-Takagaki, Y., Kashima, I., Ueno, M., Sakai, R., Itoman, M., Takaso, M. (2012): Differential age-related bone architecture changes between female and male STR/Ort mice. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 61, 59–66.
- Uchida, K., Urabe, K., Naruse, K., Ogawa, Z., Mabuchi, K., Itoman, M. (2009): Hyperlipidemia and hyperinsulinemia in the spontaneous osteoarthritis mouse model, STR/Ort. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* 58, 181–187.
- van den Bossche, J., Laoui, D., Naessens, T., Smits, H.H., Hokke, C.H., Stijlemans, B., Grooten, J., Baetselier, P. de, van Ginderachter, J.A. (2015): E-cadherin expression in macrophages dampens their inflammatory responsiveness in vitro, but does not modulate M2-regulated pathologies in vivo. *Scientific reports* 5, 12599.
- Wagner, P. (2002): Die Infektion von TNF-Rp55-Knockout-Mäusen mit *Schistosoma mansoni*. Vergleichende Untersuchungen an mit *Schistosoma mansoni* infizierten NMRI-, BL/6 und TNF-Rp55-Knockout-Mäusen bezüglich Granulomzahl und -ausprägung zum Nachweis einer möglichen TNF-Abhängigkeit der parasitären granulomatösen Reaktion. [Elektronische Ressource]. München.
- Walton, M. (1977): Degenerative joint disease in the mouse knee; histological observations. *The Journal of pathology* 123, 109–122.
- Walton, M. (1979): Obesity as an aetiological factor in the development of osteoarthritis. *Gerontology* 25, 36–41.

Wilson, M.S., Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., Wynn, T.A. (2010): Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of experimental medicine* 207, 535–552.

Wilson, M.S., Mentink-Kane, M.M., Pesce, J.T., Ramalingam, T.R., Thompson, R., Wynn, T.A. (2007): Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and cell biology* 85, 148–154.

7 Danksagung

Die Anfertigung dieser Arbeit konnte nur gelingen, weil ich eine breite Unterstützung sowie eine freundliche Aufnahme und angenehme Arbeitsatmosphäre erfahren habe.

Ich danke Frau Prof. Dr. Müller-Hilke für die Überlassung eines interessanten, herausfordernden Themas und die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Dr. Robby Engelmann bin ich für die Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen, die zahlreichen Erklärungen und Ratschläge zur Durchführung der verschiedenen ELISAs, der Durchflusszytometrie und der Zytokinfärbungen sowie geduldige Antworten auf die zwischenzeitlich aufgetretenen Fragen sehr dankbar.

Anja Osterberg danke ich für viele praktische Ratschläge, besonders zu Beginn meiner Arbeit im Labor.

Für zahlreiche Anregungen, die Einführung in die Arbeit mit Schistosomen sowie die große Hilfe bei der Aufarbeitung der Mäuse bin ich Dr. Martina Sombetzki und Nicole Koslowski äußerst dankbar.

Außerdem möchte ich mich ausdrücklich bei Nicole Deinet bedanken, die ebenfalls bei der Aufarbeitung der Mäuse half und mich bei der Durchführung des anti-SWAP-ELISAs unterstützte.

Für die Einführung in die Arbeit am Mikrotom und die Beantwortung verschiedener Fragen zur histologischen Färbung der Paraffinschnitte bedanke ich mich bei Marlies Dettmer.

Außerdem danke ich Antje, Christian, Isabell und Kathrin für viele erheiternde Gespräche im Labor und bei inoffiziellen Arbeitsgruppenbesprechungen.

Weiterhin danke ich meiner lieben Familie sehr für ihre Unterstützung, die ich sowohl während des Studiums als auch darüber hinaus erfahren habe.

Und schließlich bedanke ich mich liebevoll bei Ida für all die stärkenden, freudigen und schönen Momente, die uns unser Leben zu zweit bereitet.

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Rostock, den _____

(Unterschrift)